



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Fournès Florian

le 3 Octobre 2016

Titre :

Etude du système Xer au travers de la transmission verticale et horizontale de l'information génétique chez les bactéries.

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Microbiologie

Unité de recherche :

Centre de Biologie Intégrative, Laboratoire de Microbiologie et Génétique moléculaire, UMR 5100

Directeur/trice(s) de Thèse :

Dr. Rousseau Philippe, MCF, UT3

Dr. Crozat Estelle, MCF, UT3

Jury :

Dr. Pascal Lebourgeois, Professeur, UT3, Toulouse : Président du Jury

Dr. Mireille Betermier, Directrice de Recherche, CNRS-I2BC : Rapportrice

Dr. Marie Cecile Ploy, PU-PH, Université de Limoges : Rapportrice

Dr. Didier Mazel, Professeur, Institut Pasteur : Examinateur

Dr. Rousseau Philippe, MCF, UT3 : Directeur de Thèse

Dr. Crozat Estelle, MCF, UT3 : Co-directrice de Thèse



Remerciements

Pour commencer, je tiens à remercier les membres du jury, plus particulièrement mes deux rapportrices, d'avoir accepté de lire ce manuscrit et pour leur présence le jour de ma soutenance. La discussion fut, grâce à eux, très intéressant et enrichissante.

Je voudrais adresser à Philippe mes plus sincères remerciements ainsi que ma plus haute considération. A ses côtés j'ai pu apprendre énormément, tant sur le plan scientifique que humain. Je n'oublie pas Estelle, même si elle est de l'autre côté de la Manche, je la remercie énormément, sans elle je n'aurais pas pu apprendre si vite à contrôler les activités de FtsK. Un grand merci aussi à François pour m'avoir accueilli dans son équipe. En ce qui concerne les autres membres de l'équipe (Carine, Caroline, Luu, Maya, Elise), avec elles, j'ai passé cinq années excellentes et je les en remercie. Une mention spéciale pour Carine et Caroline qui ont subi mes attaques incessantes de demandes de résultats, en espérant qu'elles en garderont tout de même un bon souvenir. Je tiens aussi à remercier les stagiaires que j'ai encadré durant mes trois années de thèse : Marine et Armand. J'espère que tous deux vous réussirez dans vos projets professionnels, vous en avez toutes les capacités.

Je garde de très bons souvenirs des personnes rencontrées dans le bâtiment IBCG, qu'ils soient du LMGM ou du LBME. Notamment, Nathalie, Maud, Violette, Jean Yves, Marie Pierre et Patricia que je remercie pour les conseils scientifiques et les pauses déjeuner.

Je tiens à remercier l'ensemble de mes amis rencontrés au lycée ou à l'université. Merci à Pauline, Sylvain, Aude et Sophie pour leur amitié et pour les soirées, séjours à la campagne, océans ou au ski. Merci à l'ensemble de mes amis montalbanais (es) avec qui, depuis longtemps maintenant, je partage des moments de folie.

Je n'oublierai pas de remercier l'ensemble de ma famille, avec une pensée pour mes grands parents. Un grand merci à ma maman, mon frère Clément et ma soeur Manon.

SOMMAIRE

A- INTRODUCTION GENERALE	1
I- Instabilité et maintenance des génomes.....	2
II- La recombinaison spécifique de site.....	4
1. Généralités	4
2. Mécanisme	10
3. Le système de recombinaison Xer.....	11
B- RESOLUTION DES DIMERES DE CHROMOSOME ET SON DETOURNEMENT	13
I-Introduction.....	14
1. Le système XerCD/ <i>dif</i>	14
2. Contrôle de la résolution des dimères de chromosome.....	15
a- Revue FtsK	15
b- Nouvelles données sur l'interaction XerCD/ <i>dif</i> /FtsK.....	18
3. Systèmes alternatifs de gestion des dimères de chromosome.....	18
a- Les systèmes à une seule recombinase	18
b- Résolution des dimères chez les bactéries multichromosomiques	22
4. Détournement du système de XerCD/ <i>dif</i>	22
a-Présentation des IMEXs	24
b-Les bactériophages CTX, VGJ et TLC.....	25
c-Le GGI (Gonococcal Genetic Island)	28
II-Résultats	32
1. FtsK stabilise la forme intra-chromosomique du GGI en inhibant la recombinaison qui catalyse son excision.....	32
a- Résumé de la publication	32
b- Publication.....	34
c- Résultats complémentaires: comportement d'une cassette <i>dif_{GGI}</i> - <i>dif_{GGI}</i> en TPM et recombinaison <i>in vitro</i>	35
2. L'activité de translocation de FtsK n'affecte pas l'intégration du GGI.	39
III-Discussion.....	44

1. Les IMEXs de classe III.....	44
2. Activité différentielle de FtsK sur les mécanismes d'intégration et d'excision du GGI	46
3. Impact des divergences de <i>dif_{GGI}</i> sur le complexe XerCD/ <i>dif</i>	48
C- RESOLUTION DES DIMERES DE PLASMIDE ET MEGA-PLASMIDE	51
I-Introduction.....	52
1. Contrôle de la résolution des dimères de plasmide.....	52
a-Présentation.....	52
b- Les filtres topologiques et mécanismes de résolution des dimères de plasmide.....	54
2. Effets des dimères de plasmide sur le cycle cellulaire.....	55
3. Chromosomes secondaires et Méga-plasmides.....	57
a-Génèse des chromosomes secondaires	57
b- Les mégaplasmites.....	59
II-Résultats.....	62
1. Résumé	62
2. Les méga-plasmides ont adopté un système de résolution de dimère chromosomique.....	64
a- La stabilité du méga-plasmide R27 est dépendante de deux systèmes de résolution de dimères de réplicon.....	64
b- Mécanistique du système XerCD/ <i>Xrs_{R27}</i> /FtsK.....	66
c- A partir de 130 Kpb tous les méga-plasmides portent un site <i>Xrs</i> similaire au site <i>dif</i> chromosomique.....	70
d- Les sites <i>Xrs</i> des méga-plasmides se comportent comme un site <i>dif</i> chromosomique	72
e- Les sites qui résolvent les dimères de chromosome recombinent dépendamment de FtsK.....	74
III-Discussion.....	77
1. Le méga-plasmide R27 comme modèle d'étude	77
2. Polarisation des méga-plasmides.	79
3. Plasmides/méga-plasmides/chromides/chromosomes.	80
D- CONCLUSION ET DISCUSSION GENERALE.....	83
E- MATERIEL ET METHODES.....	86
1. Purification des protéines du système Xer de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	87
2. Expériences de retards électrophorétiques de migration	87
3. Tethered Particle Motion multiplexé (HT-TPM)	88
a- Préparation des lames de verre.....	88
c- Microcontact printing	89
c- Interaction ADN/billes et fixation des complexes à la lame.....	90

d- Formation des synapses de recombinaison.....	90
4. Recombinaison <i>in vitro</i>	91
5. Recombinaison <i>in vivo</i> (excision et intégration)	91
a- Excision/délétion de cassette.....	91
b- Intégration d'un mini-GGI.....	92
6. Test de translocation.....	92
7. Inhibition de la jonction de Holliday	93
8. Test Co-cultures.....	94
9. Test de stabilité de R27	95
F- BIBLIOGRAPHIE	96
 ANNEXE 1: RESOLUTION OF MULTIMERIC FORME OF CIRCULAR PLASMIDS AND CHROMOSOMES	 108
 ANNEXE 2: TABLEAU DE PLASMIDES ET SOUCHES.....	 109
1. Tableau des plasmides utilisés dans les projets GGI et méga-plasmides	109
2. Tableau des souches utilisées dans les projets GGI et méga-plasmides	110
 ANNEXE 3: TABLEAU D'OLIGONUCLÉOTIDES.....	 113
1. Oligonucléotides pour les expériences de retard sur gel et HT-TPM	113
2- Oligonucléotides pour les expériences d'arrêt de translocation	113

A- INTRODUCTION GENERALE

I- Instabilité et maintenance des génomes

Les dommages à l'ADN ainsi que l'accumulation de mutations peuvent réduire la capacité des bactéries à proliférer. Toutefois, les mutations peuvent aussi amener des avantages physiologiques à la bactérie lors d'un changement de milieu. Les chromosomes bactériens sont complexes et dynamiques. Maintenir la fine régulation entre intégrité et instabilité de leur génome est donc essentiel pour la survie de leurs descendants (Darmon and Leach, 2014). L'hérédité de l'information génétique, ou transmission verticale est permise par le maintien de l'intégrité du génome. L'intégrité de l'information génétique fait intervenir plusieurs événements comme la réplication de l'ADN, la reconnaissance des dommages et la réparation de l'ADN. L'instabilité de ces mêmes génomes peut être la conséquence de mutations ponctuelles ou de réarrangements comme la délétion, l'insertion ou l'inversion de séquences d'ADN. Cette instabilité génétique peut devenir une force pour la survie des bactéries, leur diversification, adaptation et évolution. Outre les variabilités de l'information génétique apportées par les mutations, il y a aussi les transferts horizontaux entre souches ou espèces bactériennes différentes. Ce sont les éléments génétiques mobiles qui sont les acteurs principaux des transferts horizontaux de gènes (Figure 1).

Que ce soit lors de la transmission verticale ou horizontale de l'information génétique, les génomes bactériens possèdent de nombreux mécanismes dont les mécanismes de recombinaison (Darmon and Leach, 2014) (Lenhart et al., 2012). Ces mécanismes de recombinaison sont divisés en trois classes principales ; recombinaison homologue, transposition et recombinaison spécifique de site. Le mécanisme de recombinaison homologue est basé sur l'existence de régions homologues entre les deux ADN partenaires et les protéines impliquées ne sont pas spécifiques de séquences ADN données. La transposition est un mécanisme qui permet la mobilisation autonome d'une séquence d'ADN *via* la reconnaissance de séquences spécifiques, qui flanquent l'ADN transposable, par des protéines appelées transposases. La recombinaison spécifique de site ne nécessite ni de générer, ni de dégrader de l'ADN. Son mécanisme repose sur l'interaction entre une courte séquence d'ADN appelée site de recombinaison et des

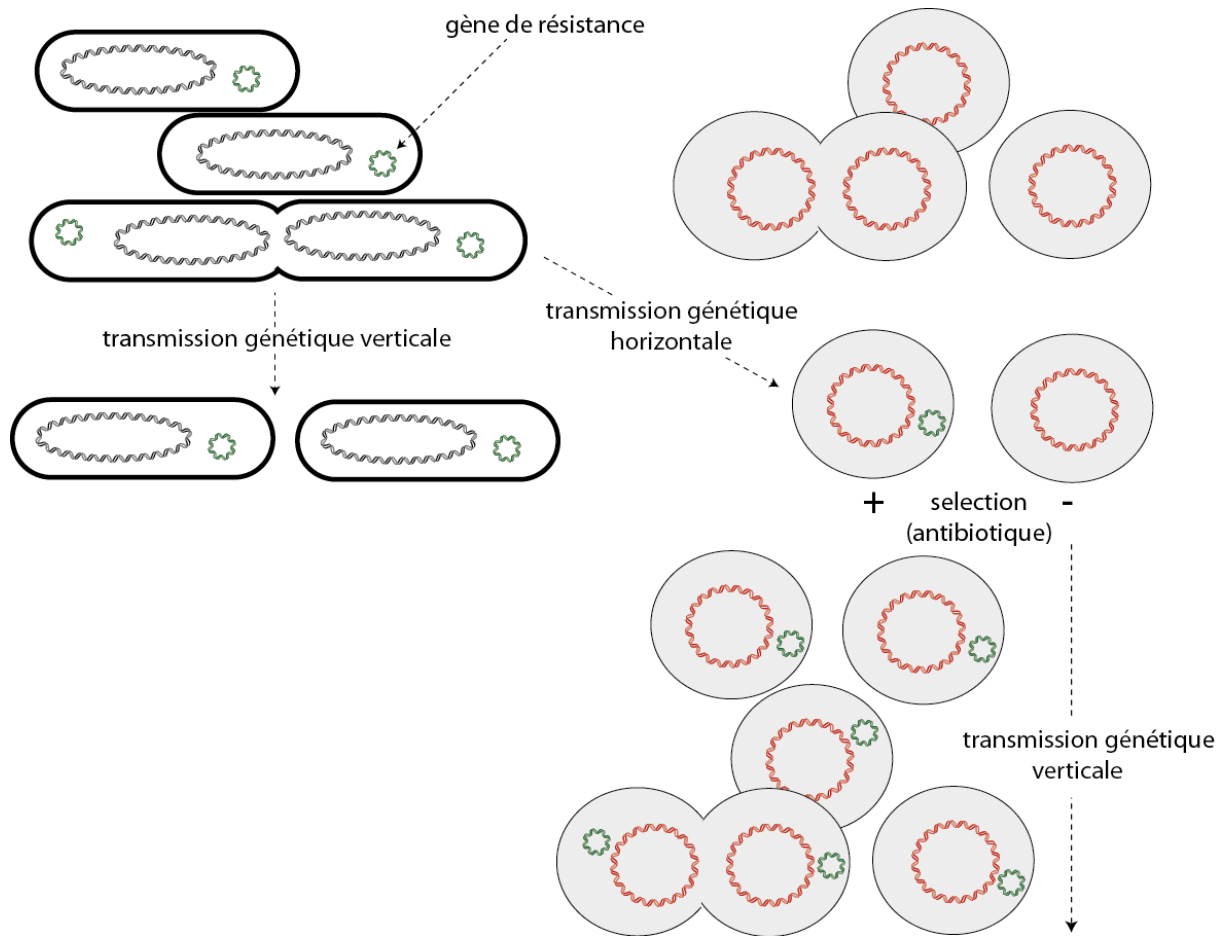


Figure 1 : Importance de la transmission verticale et horizontale de l'information génétique chez les bactéries. Deux espèces bactériennes sont représentées (Coque et Bacille). Les chromosomes bactériens sont représentés soit en noir, soit en orange. L'élément génétique mobile (plasmide) est de couleur verte. La transmission verticale de l'information génétique garantit le maintien du génome bactérien (chromosomes et plasmides) des cellules mères aux cellules filles. La transmission horizontale permet le passage d'une partie du génome bactérien (plasmide) d'une espèce à une autre. Ce plasmide peut, par exemple, porter un gène de résistance à un antibiotique et permettre la survie de la bactérie qui le contient.

protéines spécialisées appelées recombinaases. C'est ce dernier mécanisme, ses multiples implications dans la vie des bactéries et sa régulation, que j'ai étudié au cours de ma thèse.

II- La recombinaison spécifique de site

1. Généralités

Pour les réplicons circulaires bactériens, un des phénomènes impliqué dans leur instabilité est la formation de multimères. La multimérisation des molécules d'ADN circulaires est due à la recombinaison homologe (Figure 2A). Les études sur des plasmides à haut nombre de copies ont révélé que la multimérisation de ces réplicons est dépendante de RecF¹ (James et al., 1982). Cependant la formation de multimères peut avoir différents effets, dépendants du mode de répllication ou de partition du réplicon. Alors que les dimères de chromosomes non résolus sont létaux dans la plupart des cas (Figure 2B), les multimères de plasmides ont un effet certain sur leur stabilité en diminuant le nombre de copies indépendamment ségréguées au moment de la division cellulaire (Figure 2C). Ces dimères de plasmide et chromosome doivent donc être résolus. La résolution des molécules dimériques est catalysée par la recombinaison spécifique de site.

Les plasmides à haut nombre de copies ségrégent au hasard. La probabilité de générer des cellules filles ne contenant pas de plasmide est, à ce titre, inversement proportionnel à leur nombre de copies (Summers et al., 1993) (Summers and Sherratt, 1984). La répllication de ces plasmides est contrôlée par le nombre d'origines de répllication, ce qui signifie qu'un dimère de plasmide compte pour deux unités de répllication et une seule unité de ségrégation. La

¹ RecF: La protéine RecF intervient dans la voie RecFOR de réparation des cassures simple brin de l'ADN. Cette voie de recombinaison homologue, dépendante de RecA, est impliquée dans la formation des multimères de plasmides (Bedbrook and Ausubel, 1976)

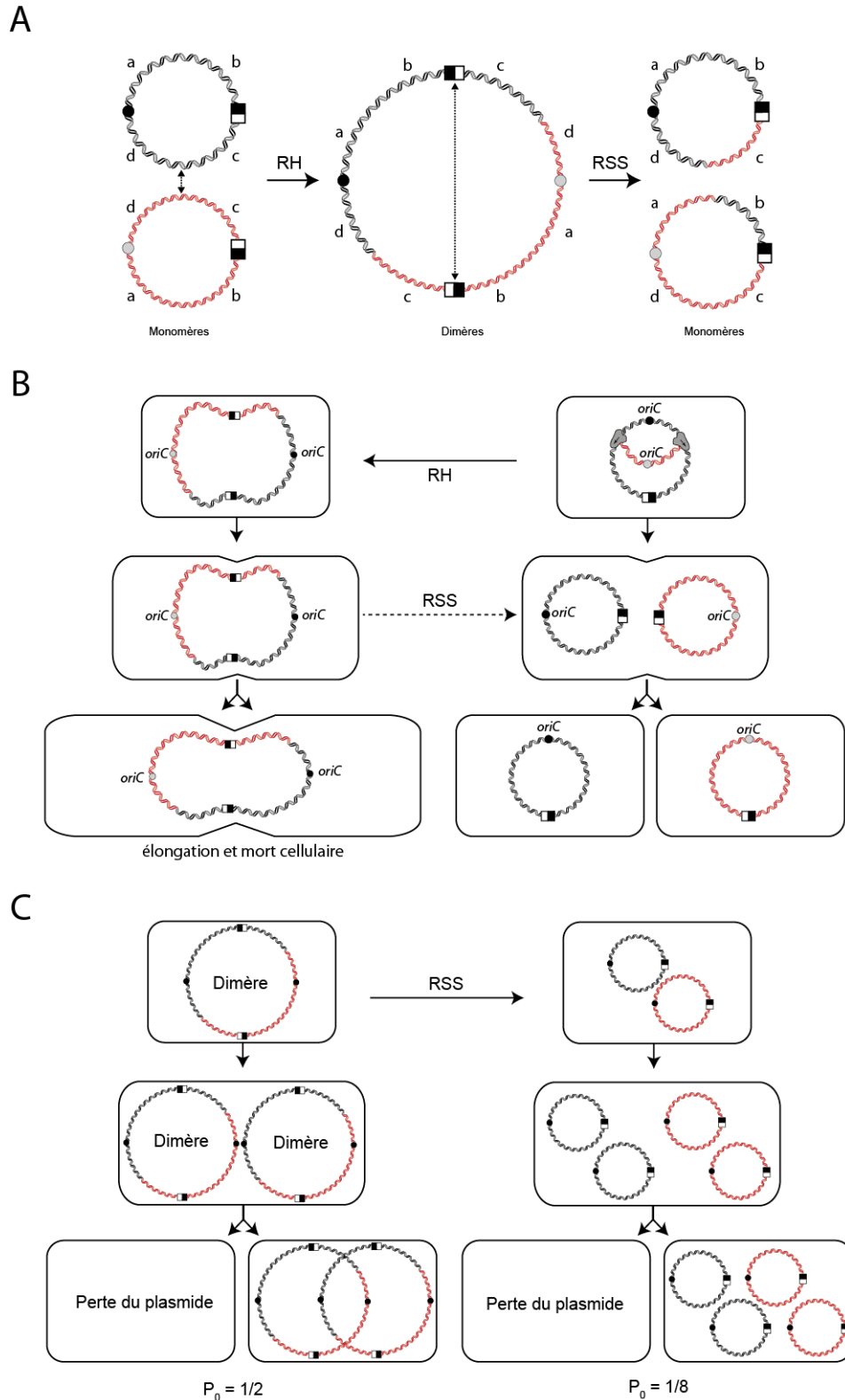


Figure 2 : Les dimères de chromosome et de plasmide. **A** : Les dimères de plasmide et chromosome sont formés par recombinaison homologue (RH) entre deux monomères (rouge et noir) durant la réplication et résolus par recombinaison spécifique de site (RSS). **B** : Les dimères de chromosome entraînent la filamentation puis la mort cellulaire. **C** : L'accumulation de dimères de plasmide dans une cellule entraîne l'augmentation de la perte du plasmide ($P_0=1/8$), comparée au plasmide monomérique ($P_0=1/2$). Les origines de réplifications sont représentées par des cercles pleins noirs, et les sites de recombinaison spécifique de site par des carrés noirs et blancs.

formation d'un dimère diminue donc le nombre de molécules ségréguées seules par rapport au nombre d'origines, augmentant la perte du plasmide. De plus, le choix de l'origine de répllication de ces plasmides se fait au hasard, un dimère a donc deux fois plus de chance d'être répliqué qu'un monomère ce qui entraîne une rapide accumulation de ses formes multimériques dans les cellules filles. Ces phénomènes regroupés sous le nom de la catastrophe des dimères est en grande partie responsable de la perte des plasmides (Figure 2C) (Summers et al., 1993) (Hodgman et al., 1998) (Field and Summers, 2011).

La recombinaison spécifique de site est une réaction durant laquelle les brins d'ADN sont coupés, échangés et reliés. Cette réaction est médiée par une machine moléculaire simple dans laquelle des enzymes spécialisées, les recombinases spécifiques de site, catalysent les échanges de brins au niveau de sites spécifiques. La recombinaison peut amener à l'intégration, l'excision ou l'inversion d'un fragment d'ADN selon le positionnement relatif des sites de recombinaison (pour revue: Grindley et al., 2006). Outre son implication dans la stabilité des plasmides et chromosomes circulaires, la recombinaison spécifique de site est aussi impliquée dans des réarrangements programmés de l'ADN comme l'intégration et l'excision de bactériophages dans les génomes de leurs hôtes, le mouvement de certaines classes d'éléments génétiques mobiles comme les transposons, intégrons ou ICE (integrating conjugative elements), l'expression de gènes de virulence ou le contrôle de gènes de développement par inversion (Hallet, 2001) (Cambray et al., 2010).

Les recombinases intervenant dans ces différents mécanismes portent le plus souvent le nom de la réaction qu'elles catalysent: résolvases, intégrases, transposases. Ces enzymes sont classées en deux grandes familles qui utilisent des mécanismes de clivage et échange de brins différents. Ces deux groupes sont les recombinases à sérine et les recombinases à tyrosine, en référence au résidu impliqué dans la réaction de clivage de l'ADN. Les recombinases de ces deux familles catalysent la réaction de recombinaison au niveau de courtes séquences d'ADN appelées sites coeurs sur lesquels les recombinases se fixent par reconnaissance de séquences parfaitement ou imparfaitement palindromiques (pour revue: Grindley et al., 2006). Les motifs de fixation des recombinases sont séparés par une région centrale dans laquelle s'effectuent les coupures et échanges de brins (Figure 3A). A part quelques exceptions le site coeur est suffisant pour que la réaction s'effectue. Certains sites sont plus complexes et contiennent aussi des séquences supplémentaires pour la fixation de

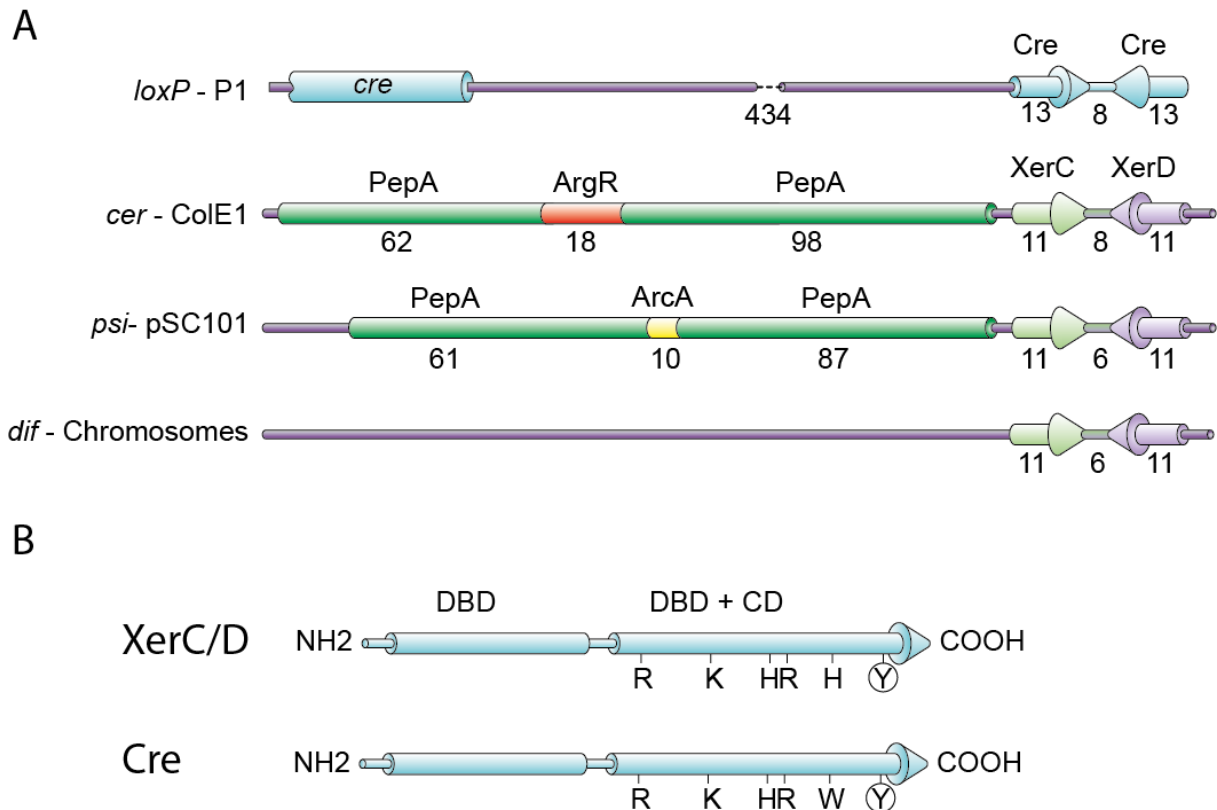


Figure 3 : Acteurs de la recombinaison spécifique de site catalysée par les recombinases à tyrosine. **A** : Structure des principaux sites de recombinaison, les sites cœur sont composés d'une région centrale entourée de deux bras de fixation, représentés par des flèches en orientation inversée, leur longueur en pb est indiquée en dessous. Pour le site de recombinaison *loxP*, le gène qui code Cre est localisé en amont. Pour les sites *cer* et *psi*, les séquences accessoires sont représentées par des cylindres verts, jaunes ou oranges. Les protéines accessoires qui s'y fixent, sont indiquées au dessus. **B** : Schématisation de la structure primaire des recombinases à tyrosine XerC/D et Cre. La tyrosine catalytique est entourée par un cercle, les autres acides aminés impliqués dans la catalyse sont aussi indiqués. Ces recombinases sont divisés en deux domaines distincts : DBD correspond au domaine de fixation à l'ADN et DBD+CD correspond à un autre domaine de fixation à l'ADN qui contient le domaine catalytique.

protéines accessoires. Ces séquences accessoires contrôlent la réaction de recombinaison pour empêcher les effets délétères sous jascents à une coupure d'ADN non contrôlée (Figure 3A). Que ce soit pour les plasmides ou les chromosomes ce système de résolution médié par recombinaison spécifique de site doit être finement contrôlé pour convertir les multimères en monomères, et non l'inverse (pour revue: Crozat et al., 2014).

Les systèmes de résolution spécifiques de site qui fonctionnent avec des recombinases à tyrosine ont des niveaux de complexité variables. Les grands plasmides conjugatifs et les prophages réplcatifs codent pour leur propre recombinase dont le gène est adjacent au site de recombinaison formant un système de résolution indépendant et fonctionnel. Au contraire, les petits plasmides, comme ceux de la famille ColE1, utilisent le système de résolution chromosomique de leur hôte. Les sites de recombinaison de ces différents systèmes peuvent être composés d'un site coeur seul, comme pour le système Cre/loxP du bactériophage P1, ou peuvent contenir des séquences de fixation pour des protéines régulatrices (Figure 3A).

Les recombinases à tyrosine sont assez différentes au niveau de leur séquence en acides aminés. Cependant la structure tertiaire de leur domaine catalytique est extrêmement conservée chez l'ensemble des membres de cette famille d'enzyme (Chen et al., 2000) (Subramanya et al., 1997). Ce domaine catalytique se caractérise notamment par la présence de six résidus conservés : R-K-H/K-R-H/W-Y. Ce motif se trouve dans le domaine carboxyl-terminal de la protéine (Figure 3B) (Gibb et al., 2010) (Grindley et al., 2006). L'ensemble de ces résidus sont regroupés dans une poche catalytique qui permet d'assurer la coupure de l'ADN et l'échange de brin. La réaction catalysée par les recombinases à tyrosine est une transestérification qui ne nécessite pas de cofacteurs métalliques ou énergétiques. La tyrosine catalytique va réaliser l'attaque nucléophile du phosphate scissile. En résulte la formation d'une liaison 3' phosphotyrosyl qui lie de manière covalente la protéine et l'ADN, et libère un groupement 5' OH. Pour cette étape, la réaction a besoin d'une base générale qui va déprotoner la tyrosine nucléophile ainsi qu'un acide général qui va protoner le groupement 5' O de l'ADN. En ce qui concerne les autres résidus de la poche catalytique, leur rôle a été démontré pour la recombinase modèle Cre (pour revue: Van Duyne, 2001). Ce modèle est généralisable aux autres recombinases à tyrosine. La lysine aurait le rôle d'acide général et la première histidine correspondrait à la base générale. Les trois autres résidus (R-R-H/W) auraient pour rôle de stabiliser l'intermédiaire pentavalent par des liaisons hydrogène avec le phosphate scissile.

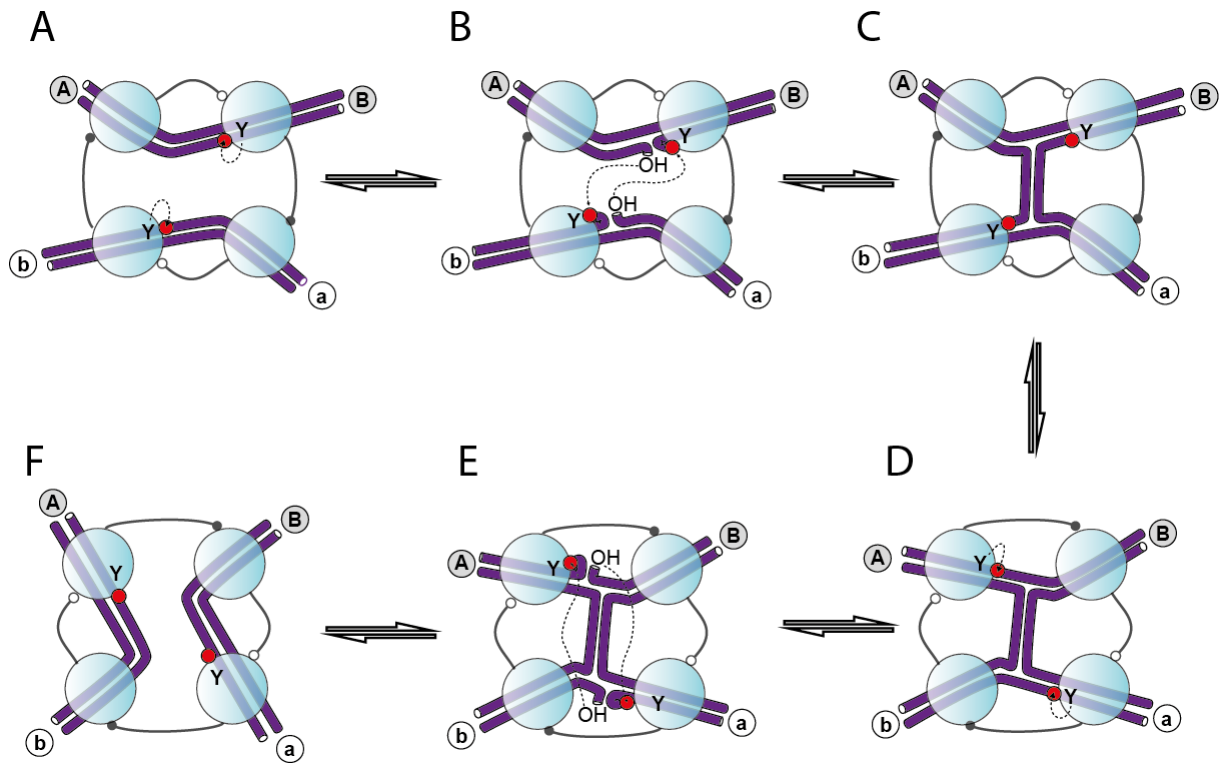


Figure 4 : Schéma du mécanisme de recombinaison catalysé par les recombinaisons à tyrosine. **A** : Quatre recombinaisons sont fixées sur leurs sites pour former la synapse de recombinaison. **B** : Un premier couple de recombinaisons actives clive l'ADN, la liaison 3'phosphotyrosyl et l'extrémité 5'OH sont représentées. **C** : échange et ligation des brins d'ADN clivés et création de la jonction de Holliday. **D** : Isomérisation de la jonction de Holliday qui active le second couple de recombinaisons. **E** : Clivage et échange de la seconde paire de brins. **F** : Ligation du second échange de brins. A ce moment là, la réaction est terminée. Par la suite, le complexe se dissocie. Les recombinaisons à tyrosine sont représentées par des cercles bleus transparents, les brins d'ADN sont représentés en violet foncé. Le couple de recombinaisons actives sont marquées par un cercle rouge représentant la tyrosine catalytique (Y). Les traits en gris représentent les interactions entre les recombinaisons dans la synapse de recombinaison. L'activation est représentée par un trait gris qui se termine par un cercle blanc. La répression est représentée par un trait gris qui se termine par un cercle gris.

2. Mécanisme

Un ensemble d'études génétiques, biochimiques et structurales des différents systèmes de recombinaison, dont les recombinases Cre et Flp, apporte les données nous permettant de définir l'organisation et le fonctionnement de la recombinaison spécifique de site impliquant ces recombinases à tyrosine. L'assemblage d'un complexe nucléo-protéique constitué de deux sites de recombinaison ainsi que de quatre recombinases est crucial pour la régulation de la réaction. Ce complexe est appelé synapse de recombinaison (Ghosh et al., 2007) (Ghosh et al., 2005) (Lee and Sadowski, 2003a). Dans ce complexe synaptique, les deux sites de recombinaison sont alignés dans une conformation anti-parallèle. A l'intérieur de ce complexe la molécule d'ADN est courbée, ce qui semble être impliqué dans le contrôle de la réaction. De ce fait, une seule paire de recombinases, diamétralement opposées, est active pour couper l'ADN (Figure 4A). De plus, dans la synapse, la courbure cache deux des quatre phosphates scissiles, un dans chaque site, ce qui permet l'attaque nucléophile de la tyrosine catalytique sur les deux autres phosphates. L'attaque nucléophile entraîne la formation d'une liaison covalente 3'-phosphotyrosyle entre la protéine et l'ADN ce qui libère un groupement 5'OH au niveau du brin d'ADN clivé (Figure 4B). Dans la synapse, les coupures entraînées par l'attaque nucléophile sont diamétralement opposées. Les brins d'ADN clivés sont ensuite échangés. Cette étape nécessite que trois ou quatre nucléotides adjacents à la coupure se déshybrident du brin complémentaire pour s'apparier aux bases complémentaires du site partenaire, ceci guidant le groupement 5'OH pour la ligation (Figure 4C) (Grindley et al., 2006) (Rajeev et al., 2009).

Cette ligation est le résultat de l'attaque nucléophile de l'extrémité 5'OH sur les liaisons 3'-phosphotyrosyle du site de recombinaison opposé après l'échange des brins d'ADN. Cette ensemble d'étapes, clivage, échange de brin et ligation, conduit à la formation d'un intermédiaire réactionnel : la jonction de Holliday (Figure 4C). La jonction de Holliday formée s'isomérisé ce qui active le second couple de recombinases (Figure 4D) (Lee and Sadowski, 2003b) (Pinkney et al., 2012). L'étude du système Cre-*loxP* a révélé que l'étape d'isomérisation de la jonction de Holliday est extrêmement rapide. La conversion de la jonction de Holliday isomérisée en produit de recombinaison est faite via un second cycle de clivage, échange de brin et ligation (Figure 4 E/F).

Le choix du premier couple de recombinaises actif est crucial pour le contrôle de la réaction. Ce choix se fait durant l'assemblage de la synapse de recombinaison (Ghosh et al., 2007). Pour le système *Cre-loxP*, les quatre recombinaises, formant un tétramère, sont reliées les une aux autres par un réseau cyclique d'interaction protéine-protéine qui implique les domaines C et N-terminal de chaque protéine (Figure 4). Cette interaction cyclique qui connecte les quatre monomères de Cre permet un dialogue donneur/accepteur entre eux (Guo et al., 1999) (Guo et al., 1997). Pendant la réaction de recombinaison complète, une déviation dans la parfaite symétrie de la synapse de recombinaison *Cre-loxP* entraîne une activation/ou inactivation séquentielle des paires de recombinaises. Dans ce mécanisme, un réajustement de l'angle des brins d'ADN dans la jonction de Holliday couplé à un changement conformationnel dans les domaines C-terminal impliqués dans les interactions donneur/accepteur expliquent l'activation et l'inactivation des couples de recombinaises (Figure 4).

3. Le système de recombinaison Xer

Le système utilisant des recombinaises à tyrosine auquel je me suis intéressé durant ma thèse est le système spécifique de site Xer. C'est un système "universel et multi-tâche" de résolution des dimères de réplicons. Il illustre comment un mécanisme de recombinaison simple peut s'adapter et accomplir des fonctions biologiques différentes, qui seront développées dans cette introduction. Les recombinaises Xer (chromosome encoded recombinaises) fonctionnent généralement en tant que hétérotétramère composé de deux recombinaises XerC et XerD (Figure 3B) (Colloms et al., 1990) (Blakely et al., 1993). Des homologues à ces deux protéines sont retrouvés dans quasiment tous les génomes des Bactéries et Archées ayant un chromosome circulaire, soulignant leur rôle conservé et important (Kono et al., 2011) (Cortez et al., 2010). Les gènes *xerC* et *xerD* sont retrouvés dans des régions différentes du chromosome, où elles sont parfois associées à d'autres gènes intervenant dans le maintien de l'information génétique (réparation de l'ADN et recombinaison) (Recchia and Sherratt, 1999). Ces recombinaises ont premièrement été

découvertes pour leur rôle dans la stabilité des plasmides, comme ColE1, en convertissant les multimères en monomères. Il n'a été démontré que plus tard que la fonction primaire du système Xer est de résoudre les dimères de chromosomes. Ces fonctions sont dépendantes de la présence de site de recombinaison sur les plasmides ou chromosomes. Ces différents sites partagent une séquence coeur d'environ 30pb ayant une structure identique. Ils contiennent des motifs de reconnaissance pour XerC et XerD de 11pb séparés d'une région de 6 à 8 pb (Figure 3A) (Hayes and Sherratt, 1997).

B- RESOLUTION DES DIMERES DE CHROMOSOME ET SON DETOURNEMENT

I-Introduction

1. Le système XerCD/*dif*

Le cas de dimérisation de molécules circulaires le plus étudié est celui de la formation des dimères de chromosomes, et la plupart des études ont été faites chez *Escherichia coli*. La formation de dimères de chromosomes arrive dans 10 à 15% des cellules d'une génération et leur résolution requiert le système Xer (Figure 1A/B) (Pérals et al., 2000) (Steiner and Kuempel, 1998). La formation des dimères de chromosome est supprimée dans une souche déficiente pour RecA². Les dimères de chromosome sont donc formés par recombinaison homologue et plus précisément lorsque cette recombinaison produit un nombre impair de crossing-over (Cox et al., 2000). Les dimères de chromosome non-résolus sont clivés et détruits par un mécanisme non connu. Ce mécanisme appelé "effet guillotine" a lieu au niveau du septum de division (Figure 2B) (Barre et al., 2001) (Lesterlin et al., 2004).

Dans le but d'éviter la destruction du chromosome dimérique, vont intervenir, chez *E.coli*, les recombinases XerC et XerD. Elles fonctionnent au niveau du site de recombinaison appelé *dif* (deletion induces filamentation). Ce site est constitué de deux sites de fixation, un pour XerC et un pour XerD séparés par une région centrale de 6pb (Figure 3A) (Blakely and Sherratt, 1994) (Hayes and Sherratt, 1997). La synapse est formée par l'interaction de deux sites *dif* et d'un hétérotétramère de XerCD. Elle n'est pas active pour résoudre les dimères de chromosomes et nécessite un activateur externe. Le contrôle de cette réaction est sous la dépendance de la translocase à ADN

² RecA: la protéine RecA d'*E.coli* fait partie d'une grande famille de protéines impliquées dans les échanges de brin d'ADN indispensables à la recombinaison homologue. Son rôle dans la recombinaison homologue est de former des filaments sur l'ADN simple brin du chromosome altéré. La formation des filaments de RecA va permettre la recherche rapide et efficace de la séquence d'ADN homologue parmi une vaste quantité d'ADN hétérologue (pour revue : (Bedbrook and Ausubel, 1976). RecA est indispensable aux deux voies de recombinaison homologue possibles RecBCD et RecFOR. Respectivement la première prend en charge les cassures double brins et la seconde les cassures simple brin de l'ADN (*cf.* note de bas de page 1) (pour revue : Kowalczykowski et al., 1994)

FtsK qui couple la ségrégation des chromosomes au cycle cellulaire (Bonné et al., 2009) (Grainge, 2010).

2. Contrôle de la résolution des dimères de chromosome

α- Revue FtsK

FtsK est une protéine multifonctionnelle composée de plusieurs domaines. Elle tient son nom du crible génétique fait chez *Escherichia coli* qui a permis de caractériser les mutations entraînant un phénotype de filamentation à haute température (Filamenting temperature-sensitive mutant). FtsK est une translocase, ou pompe à ADN, qui active la recombinaison XerCD/*dif*. Elle fait partie des protéines du divisome, et intervient dans la ségrégation de l'ADN, ses fonctions semblent conservées chez les bactéries.

En résumé FtsK est composée de trois domaines (*cf.* Figure 1a revue). Le domaine N-terminal de FtsK (FtsK-N) localise la protéine à la membrane et est requis pour la division cellulaire. C'est un domaine d'environ 200 résidus dont la séquence est peu conservée, mais il contient quatre domaines trans-membranaires qui ancrent la protéine à la membrane (*cf.* Figure 1c revue). Le domaine Linker (FtsK-L) sépare FtsK-N du domaine C-terminal de FtsK (FtsK-C). Chez *E.coli*, certaines parties de FtsK-L sont requises pour le contrôle des activités *in vivo* de FtsK, c'est un domaine riche en résidus proline et glutamine qui semble adopter une conformation en coiled-coiled. Les domaines FtsK-N et FtsK-L sont impliqués dans les interactions protéine-protéine avec d'autres protéines du divisome. Ces interactions semblent importantes dans la coordination des étapes tardives de la ségrégation des chromosomes et la division cellulaire. Le domaine FtsK-C est le domaine "signature" des protéines de la famille de FtsK. Il est sub-divisé en trois domaines; α , β , γ (*cf.* Figure 1a revue). Les domaines α et β

portent les motifs caractéristiques des ATPases ; les Walkers A et B impliqués dans la fixation et l'hydrolyse de l'ATP. Ces deux domaines forment une pompe à ADN hexamérique alors que le domaine γ joue le rôle de module de contrôle (*cf.* Figure 1c revue). Le sous domaine γ a deux activités: il se fixe à l'ADN en reconnaissant les séquences KOPS, ce qui contrôle la directionnalité de la translocation, et il interagit aussi avec XerD pour activer la résolution des dimères de chromosomes (*cf.* Figure 1d, Figure 2c et d revue) (voir revue paragraphe : Chromosome Polarization Controls Translocation et Reading Chromosome polarity). L'activation de la recombinaison nécessite donc une interaction directe et spécifique entre l'extrême C-terminal de FtsK et XerD fixé sur *dif*. Lorsque XerD est activé il catalyse le premier échange de brins. En résulte la jonction de Holliday qui est résolue par un échange de brins catalysé par XerC. Si la recombinaison n'est pas activée par FtsK, XerC catalyse le premier échange de brins, conduisant à la formation d'une jonction de Holliday instable. Cet intermédiaire abortif revient rapidement à son état initial. Ce mécanisme, indépendant de FtsK ne peut donc pas résoudre les dimères de chromosomes (voir revue paragraphe : Activating Xer Recombination).

L'hexamère formé par les domaines α et β possède un site de fixation de l'ATP par sous unité (*cf.* Figure 1c revue), localisé dans le sous domaine β , contenant tous les résidus intervenant dans la fixation et l'hydrolyse de l'ATP. Ce site actif est localisé à l'interface entre deux sous-unités de l'hexamère. FtsK transloque à une vitesse de 5Kb/s à température ambiante et jusqu'à 17Kb/s à 37°C. Elle a aussi la capacité de transloquer contre une force de 60pN qui correspond à la force de dénaturation de l'ADN double brin. L'activité de translocation de FtsK consomme une molécule d'ATP par sous unité de l'hexamère pour avancer de 2pb (voir revue paragraphe : Mechanism of DNA translocation). En translocant et en suivant la direction des KOPS, FtsK arrive au site *dif*. Durant cette course rapide, FtsK chasse toute protéine fixée à l'ADN (EcoRI, Tus, RNAPol). Elle s'arrête spécifiquement sur un complexe XerCD/*dif*. L'arrêt de translocation de FtsK sur les complexes Xer a premièrement été observé par des expériences *in vitro*. FtsK s'arrête quand elle rencontre XerCD ou XerD fixé à *dif* ; elle s'arrête aussi lorsqu'elle arrive sur un complexe Cre/*loxP*, mais pas sur XerC seule. Ce phénomène pourrait s'expliquer par la faible affinité de XerC pour le site *dif* en absence

de XerD. Etonnamment, l'arrêt de translocation n'est pas dépendant de la présence du sous domaine FtsK γ . (voir revue paragraphe : Activating Xer Recombination)

L'ensemble des fonctions et caractéristiques de FtsK, ainsi que de ses homologues est rapporté dans la revue qui suit. Cette revue rend aussi compte de la complexité de l'organisation du génome bactérien indispensable au maintien de son intégrité au cours des générations.

The FtsK Family of DNA Translocases Finds the Ends of Circles

Estelle Crozat · Philippe Rousseau · Florian Fournes · François Cornet

Laboratoire de Microbiologie et de Génétique Moléculaires, CNRS, and Université de Toulouse, Université Paul Sabatier, Toulouse, France

Key Words

DNA transport · Chromosome dimers · Chromosome segregation · DNA translocase · FtsK · SpoIIIE

Abstract

A global view of bacterial chromosome choreography during the cell cycle is emerging, highlighting as a next challenge the description of the molecular mechanisms and factors involved. Here, we review one such factor, the FtsK family of DNA translocases. FtsK is a powerful and fast translocase that reads chromosome polarity. It couples segregation of the chromosome with cell division and controls the last steps of segregation in time and space. The second model protein of the family SpoIIIE acts in the transfer of the *Bacillus subtilis* chromosome during sporulation. This review focuses on the molecular mechanisms used by FtsK and SpoIIIE to segregate chromosomes with emphasis on the latest advances and open questions.

© 2015 S. Karger AG, Basel

Introduction

Active DNA transport plays key roles in orchestrating the dynamics of bacterial genomes. Proteins of the FtsK family are DNA transporters that translocate double-stranded DNA. They include proteins involved in cell di-

vision and chromosome segregation during vegetative growth, such as FtsK in *Escherichia coli* [Lesterlin et al., 2004; Sherratt et al., 2010], and proteins required for the transfer of the chromosome into forming spores, such as SpoIIIE in *Bacillus subtilis* [Wu and Errington, 1994]. Noteworthy, the FtsK family also contain the Tra proteins involved in the transfer of conjugative elements in *Streptomyces* [Kataoka et al., 1991; Kendall and Cohen, 1987; Smokvina et al., 1991]. FtsK is associated with the cell division septum. It acts at the last steps of chromosome segregation and their coupling with cell division. In particular, it is strictly required for the resolution of dimeric sister chromosomes that may form during replication. It does so by controlling the XerCD/*dif* site-specific recombination system that resolves chromosome dimers. SpoIIIE is associated with the division septum of sporulating cells, which closes leaving about two thirds of the chromosome out of the forming spore. SpoIIIE is strictly required for the packaging of these last two thirds of the chromosome into the spore.

The FtsK family of translocases is highly conserved throughout bacteria [Aussel et al., 2002; Bath et al., 2000; Possoz et al., 2001]. Translocation has been demonstrated in vitro for SpoIIIE [Bath et al., 2000] and FtsK [Aussel et al., 2002], and ‘single molecule’ experiments have shown that both proteins are powerful motor that mobilizes DNA against high forces at high speed [Graham et al., 2010a; Lee et al., 2012; Pease et al., 2005; Ptacin et al.,

2008; Saleh et al., 2004]. Recent data have provided significant advances into the mechanism and control of DNA translocation by FtsK and SpoIIIE. This review briefly describes the FtsK family and focuses on the different activities of FtsK and SpoIIIE with emphasis on the recent advances and open questions.

The FtsK Family of DNA Translocases

E. coli FtsK is a multifunctional and multidomain protein (fig. 1, 2). The N-terminal domain (FtsK-N) localizes the protein at the membrane and is required for cell division [Begg et al., 1995; Bisicchia et al., 2013; Draper et al., 1998; Dubarry and Barre, 2010; Yu et al., 1998a]. This ~200-residue-long domain is poorly conserved at the sequence level. It contains 4 transmembrane helices, which tether the protein to the cell membrane and hexamerizes at the division septum [Bisicchia et al., 2013].

The linker domain FtsK-L separates FtsK-N from the C-terminal domain (FtsK-C, corresponding to the translocation motor [Bigot et al., 2007]), and may thus extend into the cytoplasm from the division septum (fig. 1, 2). FtsK-L shows high sequence and length variability. The longest linkers (~600 aa) are found in γ -Proteobacteria. In *E. coli*, some parts of FtsK-L are required for the control of FtsK activities in vivo [Bigot et al., 2004; Dubarry and Barre, 2010; Dubarry et al., 2010]. The longest linkers tend to be rich in proline and glutamine residues, and many are predicted to adopt coiled-coiled structures. FtsK-L, together with the FtsK-N domain, confers protein-protein interaction with other proteins of the division septum: FtsZ, Q, L and I. These interactions seem to be important for the correct coordination between the late stages of chromosome segregation and cell division [Dubarry et al., 2010; Grainge, 2010].

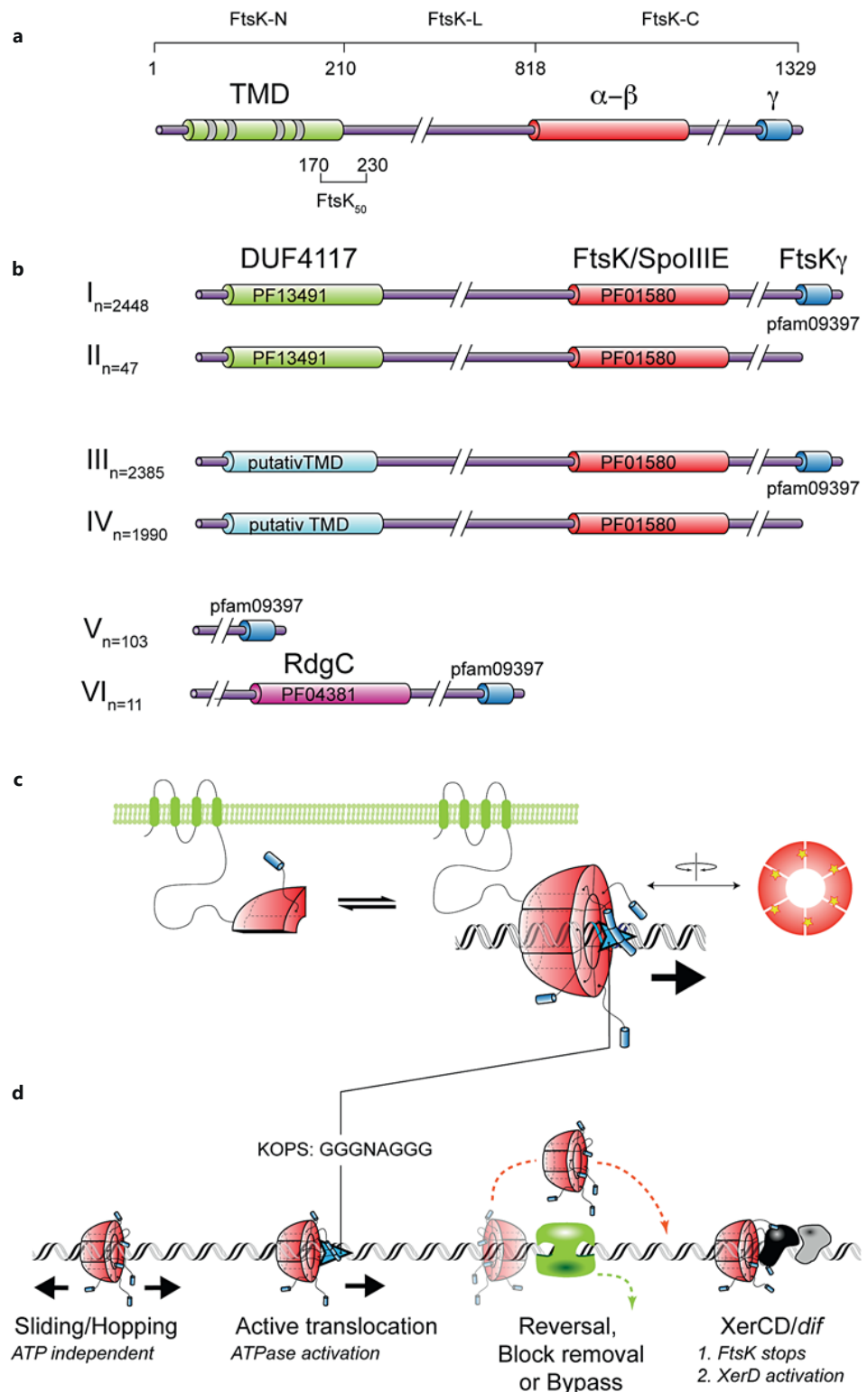
FtsK-C is the signature domain of the FtsK family. It can be further subdivided into α -, β - and γ -subdomains (fig. 1) [Yates et al., 2003]. The α - and β -subdomains form the DNA pump [Massey et al., 2006], while the γ -subdomain acts as a control module [Yates et al., 2006]. Structural information on the hexameric motor has been obtained for *Pseudomonas aeruginosa* FtsK-C [Massey et al., 2006] deleted for the γ -subdomain. The structure shows a hexamer formed by the α - and β -subdomains, 12 nm in diameter, with a 3-nm hole in the middle that accommodates double-stranded DNA (fig. 1c). The β -subdomain contains a core RecA-like fold (with Walker P-loop and B motifs), and generates the force required for DNA translocation. It is both the conservation of several sequence motifs, distinct β -strand topology from other P-loop ATPases, and the ability to translocate dsDNA that specifies the FtsK family of translocases. At the tail end of FtsK-C, the FtsK- γ subdomain forms a winged helix-turn-helix (wHTH) that is attached to the β -domain via a flexible linker. wHTH folds are commonly associated with DNA binding, while some participate in protein-protein interactions [Gajiwala and Burley, 2000]. The FtsK- γ subdomain has both activities: it binds DNA, which controls the directionality of translocation, and interacts with the XerD recombinase to induce chromosome dimer resolution [Ptacin et al., 2006; Sivanathan et al., 2006; Yates et al., 2006].

FtsK homologues are present in bacteria and archaea [Iyer, 2004]. BlastP analysis of *E. coli* FtsK confirms three structural domains (fig. 1c; 9,858 hits): DUF4117 (pfam: PF13491; FtsK-N), FtsK/SpoIIIE (pfam: PF01586; DNA pump) and FtsK- γ (pfam: PF09397; control module) [Altschul and Lipman, 1990]. This NLC organization is found for 2,448 sequences (24%; fig. 1c, class I) including FtsK, SpoIIIE and the Tra proteins [Vogelmann et al., 2011]. Consistent with this organization, both SpoIIIE and Tra are membrane proteins that translocate dsDNA

Fig. 1. FtsK organization and function. **a** Schematic representation of the *E. coli* FtsK protein. FtsK is 1,329 amino acids long and is divided into three parts: FtsK-N, FtsK-L and FtsK-C. FtsK-N contains a transmembrane domain (TMD, green), whereas FtsK-C contains the motor domain ($\alpha\beta$ in red and γ in blue). The FtsK₅₀ domain, fused to FtsK-C for in vitro studies, is represented. For more details see the text. **b** Schematic representation of the architectures observed within the FtsK family. Six classes of architectures (I–VI) are found in bacteria and archaea (n is the number of proteins showing the architecture). The color code is similar to the one used in **a** and the pfam ID of the domains is given. **c** Schematic

representation of the hexamerization of membrane-tethered FtsK on DNA. A hexamer is also represented as a front view to depict the localization of ATPase sites. The color code is similar to the one used in **a**. **d** Summary of the different movements proposed to be achieved by FtsK and/or SpoIIIE. First, a sliding/hopping mechanism could be used by the translocases to find specific sequences (KOPS or SRS), and their recognition would activate ATP hydrolysis. An opening of the hexamer could allow reversals or bypass of obstacles. FtsK finally activates recombination by a direct interaction with XerD.

(For figure see next page.)



1

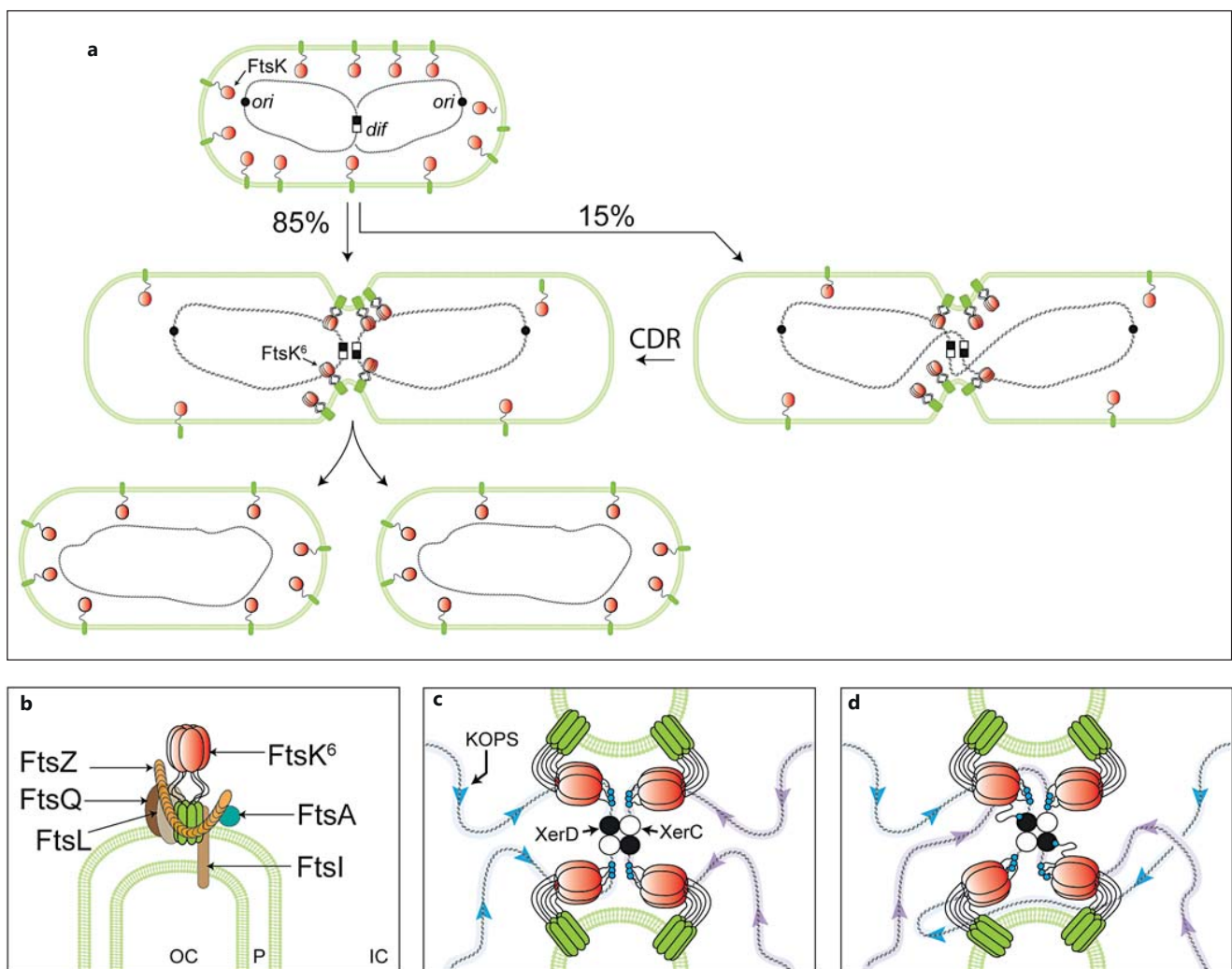


Fig. 2. Roles of FtsK in vegetative growth. **a** Representation of the localization of FtsK during the *E. coli* cell cycle. Note that FtsK forms hexamers (FtsK⁶) as it localizes at the septum. Fifteen percent of the cells form chromosome dimers (right panel), which are resolved by the XerCD/*dif* site-specific recombination system. CDR = Chromosome dimer resolution. **b** Zoom on the localization of FtsK⁶ at the septum (e.g. FtsK hexamers localized at the septum on the two middle schemes on **a**). Proteins interacting with FtsK

are represented. OC = Outer cell; P = periplasm; IC = inner cell. **c** Zoom on the localization of FtsK⁶ at the septum in the case of monomeric chromosomes (**a**, left middle panel). FtsK is represented using the same color code as in figure 1: FtsK-N in green, FtsK-C in red and FtsK-Y in blue. **d** Zoom on the localization of FtsK⁶ at the septum in the case of dimeric chromosomes (**a**, right middle panel). Note that the FtsK-Y domain, which activates XerD, is also involved in KOPS recognition.

and recognize short DNA motifs to orient translocation [Besprozvannaya et al., 2013; Cattoni et al., 2014; Fiche et al., 2013; Possoz et al., 2001; Ptacin et al., 2008; Reuther et al., 2006; Vogelmann et al., 2011]. A phylogenetic study of the FtsK family suggests that Tra proteins are derived from an FtsK-like ancestor protein, suggesting that *Streptomyces* adapted an FtsK-like chromosome segregation process to exchange DNA [Vogelmann et al., 2011].

A second architecture, in which the transmembrane domain seems to be absent, is found in 2,385 sequences (24%; fig. 1c, class III). SftA, one of the FtsK homologs of *B. subtilis*, is a member of this class but nevertheless localizes at the division septum [Biller and Burkholder, 2009; Kaimer and Graumann, 2011; Kaimer et al., 2011]. A close analysis of the BlastP result reveals that the amino-terminal part of class III proteins contains three putative

transmembrane motifs, suggesting that classes I and III correspond to the same functional architecture (fig. 1c). Interestingly, two additional classes, II and IV, lack recognizable FtsK γ subdomain but are otherwise similar to classes I and III, respectively. No functional data are available on these proteins to our knowledge. Lastly, some proteins (103) are only composed of the FtsK- γ subdomain. These proteins may play different roles, since winged-helix domain are implicated in interactions with other proteins or DNA [Aravind et al., 2005]. They may nevertheless play a role in Xer recombination since isolated FtsK- γ can activate recombination in *E. coli* [Grainge et al., 2011]. FtsK- γ is also found associated with RdgC, a DNA-binding protein involved in controlling homologous recombination [Cox, 2007], in 11 proteins. Nothing is known about the function of these particular proteins.

HerA is a homologue of FtsK found in archaea, and in all bacteria without FtsK [Iyer, 2004], but its architecture differs from what is observed for the FtsK family in Bacteria. The 'motor domain' of HerA is neither associated with a transmembrane domain nor γ -subdomain, but with a domain implicated in interaction with nucleases [Iyer, 2004]. HerA was subsequently found to be part of a complex acting in DNA repair [Hopkins and Paull, 2008]. Its role in chromosome segregation, if any, is still to be established.

Mechanism of DNA Translocation

The FtsK $\alpha\beta$ hexamer possesses one 'ATP binding' site per subunit, located in the β -domain, which contains all the conserved residues for binding and hydrolysis of ATP [Massey et al., 2006]. This site is situated at the interface between two subunits and involves as well the participation of an 'arginine finger' from the neighboring subunit [Croizat et al. unpubl. data], which could coordinate ATP hydrolysis within the hexamer.

In the structure of the hexameric motor, all the sites are bound with ADP [Massey et al., 2006]. In this configuration, five loops can be detected in the central channel that could contact DNA and potentially change configuration during ATP hydrolysis, but the absence of DNA in the structures renders this still hypothetical. From the structural data, a mechanism of translocation referred to as the 'rotary inchworm mechanism', proposed two contacts between DNA and each subunit of the motor: one in the α -domain, the other one in the β -domain. A movement of the α -domain would provoke DNA translocation [Massey et al., 2006]. Each monomer

would be active sequentially, and therefore any alteration in the hexamer structure would strongly impair the translocation activity. Noteworthy, this model was proposed based on a comparison between two slightly different structures of FtsK monomers, which was rather speculative.

A more recent study using linked monomers showed that two inactive subunits (Walker A or B mutants) within a hexamer did not impair translocation speed, suggesting that several motor subunits must interact with DNA at any time [Croizat et al., 2010]. This work led to the proposal of a 'staircase mechanism', in which multiple adjacent monomers contact DNA simultaneously, in a spiral staircase-like arrangement, each one being in a different nucleotide-binding state. This mechanism has been shown to take place in other hexameric translocases like the E1 papillomavirus helicase [Enemark and Joshua-Tor, 2008] or the RNA translocase Rho [Thomsen and Berger, 2009].

A third mechanism has been proposed recently for most dsDNA translocases. In this 'revolution' model, the double-stranded DNA revolves inside the channel formed by the protein, without modifying DNA supercoiling. This mechanism has been shown for the bacteriophage Φ 29 packaging motor [Kumar and Grubmüller, 2014; Schwartz et al., 2013] and proposed for many other translocases, based on the size of the pore formed by the multimers, including FtsK and SpoIIIE [De-Donatis et al., 2014]. However, this mechanism implies a loss of activity when one subunit is mutated in the ring [Schwartz et al., 2013], which appears in contradiction with the translocation activity retained by a hexamer of FtsK containing two opposed inactive subunits [Croizat et al., 2010].

Translocation by FtsK $\alpha\beta$ motors has been studied by looking at their ability to displace special structures of DNA: either triple helix formed by short, labeled oligonucleotides or T-shaped DNA. The most appropriate methods are however single-molecule setups, which allowed to deduce the speed of translocation: from 5 kb/s at room temperature [Pease et al., 2005; Saleh et al., 2004] up to 17 kb/s at 37°C [Lee et al., 2012]. It was also measured that FtsK could translocate against an opposing force of 60 pN, which corresponds to a force denaturing dsDNA [Pease et al., 2005]. Data available so far suggest a step size of 2 pb per ATP hydrolyzed, and therefore per subunit [Croizat and Grainge, 2010; Croizat et al., 2010; Massey et al., 2006; Saleh et al., 2005]. Translocation induces only a slight level of positive supercoiling ahead of the translocase, suggesting FtsK does not track the DNA groove, but uses another type of DNA-protein interac-

tion. Saleh et al. [2005] measured the introduction of one supercoil every 150 bp, which would allow the high translocation speed measured, as well as little perturbation of the chromosomal supercoiling state while translocating several thousands of base pairs.

In early single-molecule experiments designed to monitor FtsK-C translocation, the protein was not directly observed. The number of FtsK motors present on single DNA molecules was thus unknown, which may explain some of the findings: for example that FtsK-C extruded DNA loops or was working as a double hexamer [Bigot et al., 2005; Massey et al., 2006]. Direct visualization of FtsK-C using TIRF microscopy showed that FtsK could act as a single hexamer and did not extrude DNA loops while translocating [Lee et al., 2012]. Using this setup, frequent changes in direction were observed, suggesting FtsK-C can dissociate from the DNA and reassociate quickly.

In vitro, FtsK-C can displace other DNA-binding proteins while translocating (fig. 1d). The same activity has been observed for SpoIIIE in vivo [Marquis et al., 2008]. Lee et al. [2012] further showed that FtsK-C was not necessarily displacing proteins, but instead could either push them or bypass them, and that the result of the encounter depended on the affinity the protein had for its binding site. Hence, RNA polymerase was pushed most of the time, while more tightly bound proteins like LacI mostly induced a reversal of FtsK-C, or were bypassed. The bypasses events show that FtsK-C can briefly disassociate from DNA and continue its translocation further. This suggests that the hexameric motors can open and close to bind or release DNA, while staying hexameric. The existence of two distinct hexameric states, one translocating and one not translocating but binding DNA, has also been recently proposed for SpoIIIE [Cattoni et al., 2013, 2014]. A similar opening-closing mechanism has been proposed for the hexameric replicative helicase of the simian virus 40. This helicase acts as a single hexamer able to bypass covalently conjugated roadblocks on strand templates [Yardimci et al., 2012].

Chromosome Polarization Controls Translocation

It has been recognized far before the genomic era that the two strands of the DNA molecules composing bacterial chromosomes are asymmetrical in their base composition [e.g. Rudner et al., 1969]. This asymmetry was later shown to divide chromosomes into replichores of opposite polarity, which coincide with the replication arms [Blattner et al., 1997; Lobry, 1996]. Replichores show

skewed base composition with one strand enriched in purine bases compared to the other strand (GC skew). This is accompanied by skewed orientation of genes and of numerous short DNA motifs from the replication origin (*ori*) to the opposite termination region (*ter*) [Rocha, 2008; Touzain et al., 2011]. Perturbations of the replichore organization by large inversion of chromosome segments are often lethal or highly detrimental [Campo et al., 2004; Esnault et al., 2007; Lesterlin et al., 2005]. Indeed, while chromosome inversions are frequent, important unbalance of the two replichores is counter-selected in bacteria [Eisen et al., 2000; Suyama and Bork, 2001]. In this context, the discovery of the site for resolution of *E. coli* chromosome dimers, *dif*, and its location at the terminal junction of the replichores [Blakely et al., 1991; Clerget, 1991; Kuempel et al., 1991] led to the hypothesis that this particular position has a functional relevance. The *dif* site is recombined by the XerC and XerD site-specific recombinases to resolve dimeric forms of the chromosomes arising by sister chromatid exchanges [Lesterlin et al., 2004]. Displacement of the *dif* site confirmed the importance of its special position [Cornet et al., 1996; Kuempel et al., 1996; Leslie and Sherratt, 1995; Tecklenburg et al., 1995]. It was found that sequences directly surrounding *dif* are not important for dimer resolution activity but that the orientation of these sequences is crucial [Pérols et al., 2000]. In the meantime, it was shown that recombination between *dif* sites requires the translocation activity of FtsK [Capiaux et al., 2002; Recchia et al., 1999; Steiner et al., 1999]. Together, these findings led to the discovery of short G-rich specific DNA motifs polarizing the chromosome, named KOPS, and the subsequent demonstration that they orient the translocation activity of FtsK towards the *dif* site [Bigot et al., 2005; Levy et al., 2005] (fig. 1d). This raised the question of an equivalent mechanism to orient SpoIIIE activity during sporulation. Motifs closely resembling the *E. coli* KOPS, the SpoIIIE recognition sequences (SRS), were found to orient SpoIIIE activity [Ptacin et al., 2006]. Noteworthy, in the case of sporulation, the two sister cells are not equivalent. This allows a different assembly of SpoIIIE on each side of the asymmetric division septum that may participate in the directionality of translocation [Sharp and Pogliano, 2002]. Most recent findings show that SpoIIIE complexes are preferentially located on the mother cell side of the sporulation septum during translocation, suggesting their assembly is controlled by SRS polarization [Becker and Pogliano, 2007; Fiche et al., 2013].

The high conservation of FtsK in bacteria suggests that its role in chromosome segregation is conserved. Most

bacteria harbor at least one circular chromosome that must experience frequent dimerization. Consistent with this view, the XerCD/*dif* system is also conserved [Carnoy and Roten, 2009; Kono et al., 2011], although it has been replaced independently by a noncanonical Xer system (i.e. using a single recombinase only distantly related to XerC and XerD) in some families of bacteria [Le Bourgeois et al., 2007]. The FtsK homologue and the noncanonical Xer system of *Lactococcus lactis* have been shown to function basically as their *E. coli* counterparts. They can even functionally replace the FtsK-XerCD/*dif* system when transposed to *E. coli* [Nolivos et al., 2010]. Some bacteria encode more than one FtsK homologue. In *B. subtilis*, the two FtsK homologues, SpoIIIE and SftA, are both required for full viability during vegetative growth [Kaiser and Graumann, 2011]. Their role partly depends on RecA, suggesting they play both specific and redundant roles in resolution of dimers. Other special cases are multichromosome bacteria. In *Vibrio cholerae*, both chromosomes harbor a *dif* site, whose activity depends on a single FtsK homologue [Val et al., 2008]. KOPS-driven chromosome segregation by FtsK thus appears to be ubiquitous in bacteria. A general search for polarized motifs with KOPS characteristics identified candidate motifs in most bacterial families [Hendrickson and Lawrence, 2006]. The 5'-GGGCAGGG motif, which is the most abundant KOPS in *E. coli* (5'-GGGNAGGG), could play the same role in a wide variety of bacteria. However, other motifs have been co-opted to orient FtsK activity in some bacteria families. This has been characterized in Firmicutes. *B. subtilis*, the genome of which contains 43% GC (compared to 51% for *E. coli*), uses the 5'-GAGAAGGG motif to orient SpoIIIE translocation [Ptacin et al., 2006]. *L. lactis*, whose genome is shorter than the *E. coli* and *B. subtilis* ones and AT rich (35% GC), uses a shorter and A-rich motif, 5'-GAAGAAG [Nolivos et al., 2012]. Thus, during evolution, FtsK appears to have co-opted convenient motifs (i.e. with correct number and skew) to orient its activity.

Reading Chromosome Polarity

Independent of the FtsK α structure, a structure of the *P. aeruginosa* FtsK γ subdomain bound to a KOPS motif (GGGCAGGG) was obtained [Löwe et al., 2008]. It shows a particular configuration, where three FtsK γ bind one KOPS (fig. 1c). Two FtsK γ recognize the GGG triplets by a strong insertion into the minor groove of DNA. The third FtsK γ binds with very few direct contacts on the CA

central dinucleotide. This would explain the lack of conservation of the fourth (C) position in the KOPS sequences [Bigot et al., 2005]. The three FtsK γ subdomains also interact with each other [Löwe et al., 2008]. This seems to be conserved in SpoIIIE [Besprozvannaya et al., 2013].

How and when FtsK and SpoIIIE recognize KOPS/SRS motifs is still under debate. Studies on FtsK-C suggested that it binds directly and hexamerizes on KOPS motifs [Graham et al., 2010b; Löwe et al., 2008], whereas SpoIIIE was proposed to bind nonspecific DNA as a hexamer, then search for SRS motifs by sliding and hopping on DNA without ATP hydrolysis [Cattoni et al., 2013]. Indeed, both proteins bind nonspecific DNA in the absence of ATP. In two different experiments relying on the direct observation of fluorescent protein hexamers on single DNA molecules, FtsK-C located at KOPS at the first observable step of the experiment [Lee et al., 2012], whereas SpoIIIE bound nonspecific DNA then slowly relocated to SRS motifs (SpoIIIE) [Cattoni et al., 2014]. In both cases, the dissociation rate was higher from nonspecific DNA than from KOPS/SRS. Whether or not the two proteins behave differently with respect to KOPS/SRS binding remains to be clearly established. Despite differences in the loading mechanism, the two studies agreed that KOPS/SRS motifs are preferred sites for the initiation of translocation [Cattoni et al., 2013, 2014; Lee et al., 2012], thus controlling the sense of translocation at an initial step.

A debate is also still going on whether KOPS/SRS are recognized during translocation, and therefore induce dissociation of the motor or a change in direction if encountered in the nonpermissive orientation [Bigot et al., 2006; Levy et al., 2005]. Clearly, FtsK-C can change direction while translocating DNA (see above and fig. 1d). Locations of turn or pauses were precisely determined on a λ -DNA containing 3 KOPS [Lee et al., 2012]. This experiment showed that FtsK-C translocation reversal was independent of the presence of KOPS. This raises the question of the situation in vivo. Translocation reversal could be problematic for effective chromosome segregation. Alternatively, the direction given by the KOPS could be kept through a yet unknown mechanism. The involvement of FtsK-L and FtsK-N on the FtsK-C activity has not been tested. The recent finding that FtsK-N alone hexamerizes in the division septum raises the possibility that the absence of FtsK-N in the proteins used in vitro changes their behavior [Bisicchia et al., 2013].

Further studies on SpoIIIE showed that the SpoIIIE γ subdomain is responsible for (a) inhibition of the ATPase activity in the absence of DNA and (b) a strong activation of ATPase activity in presence of SRS through oligomer-

ization of the SpoIIIE γ subdomain [Besprozvannaya et al., 2013]. The observation of open and closed rings of SpoIIIE led to the hypothesis that SpoIIIE has an open, translocation-impaired conformation, which is then closed and becomes active when SpoIIIE γ recognize a permissive SRS. Besprozvannaya et al. [2013] also suggested that the presence of regular, but spaced SRS on the chromosome would allow ATPase reactivation during translocation. This hypothesis is attractive since it would explain the high density of KOPS/SRS signals on the chromosomes. However, it would imply that SpoIIIE recognizes permissive SRS while translocating, which has not been observed directly so far. Alternatively, deactivation of ATP hydrolysis may be due to opening of the SpoIIIE hexamer and would resume upon SRS recognition by hexamer closing.

Activating Xer Recombination

The final goal of FtsK/SpoIIIE-oriented translocation is to reach the zone of converging KOPS/SRS signals where the *dif* site lies. In *E. coli*, this is required for resolution of chromosome dimers by XerC and XerD-mediated recombination between *dif* sites [Lesterlin et al., 2004]. FtsK stops translocation on XerCD/*dif* complexes and activates recombination. Activation involves a specific interaction of the FtsK γ subdomain with XerD [Grainge et al., 2011]. This requirement for activation by FtsK is conserved in *V. cholerae* [Val et al., 2008] and *L. lactis*, despite its unconventional Xer system using a single recombinase [Nolivos et al., 2010]. Data are still missing in other bacteria. The control of chromosome dimer resolution appears different in archaea since the XerA recombinase can recombine the *dif* sites in the absence of any other factor in vitro [Cortez et al., 2010; Duggin et al., 2011].

Arrest of FtsK translocation on Xer complexes was first observed in bulk in vitro experiments [Graham et al., 2010a]. FtsK was shown to stop when encountering XerCD or XerD bound to *dif*; FtsK also stopped when encountering Cre, a recombinase related to XerD, but not XerC alone, which may be related to the poor affinity of XerC to the *dif* site in absence of XerD. Surprisingly, stoppage was not dependent on the presence of the FtsK γ subdomain. Translocation arrest was also revisited recently using TIRF microscopy [Lee et al., 2014]. Contrary to ‘non-specific’ proteins (i.e. EcoRI, Tus or RNAPol, see above), XerCD are not pushed off their binding site. Instead, FtsK pauses and reverses most of the time when reaching XerCD/*dif*. The authors detected a difference in pause

times depending on which protein is encountered first: XerC induces a pause time similar to nonspecific proteins, whereas XerD induces a shorter pause depending on the presence of the FtsK γ subdomain. These results thus slightly contrast with previous ones. The difference might be explained by the different FtsK proteins used (*Pa*FtsK monomers vs. *Ec*FtsK trimers), which could have different behaviors in solution, and/or the length of the DNA used.

It has long been thought that FtsK was required to form the XerCD/*dif* recombination complex (consisting of a XerCD heterotetramer gathering two *dif* sites) [Capioux et al., 2002]. Recent data argue against this hypothesis. In vivo, the two *dif* sites stay together during the whole postreplicative period (to the resolution limit of optical microscopy [Stouf et al., 2013]). In vitro, the recombination complex readily forms in the absence of FtsK, and these complexes can subsequently be activated by FtsK [Diagne et al., 2014; Zawadzki et al., 2013]. FtsK thus certainly reaches and stops on preformed recombination complexes.

Once in contact with the recombination complex, FtsK activates recombination. This step strictly requires FtsK γ [Yates et al., 2003, 2006]. Consistently, FtsK γ can activate recombination in the absence of FtsK $\alpha\beta$ [Grainge et al., 2011; Nolivos et al., 2010]. However, recombination activation by FtsK γ attached to the FtsK $\alpha\beta$ motor domain requires more than the simple FtsK γ -XerD interaction. FtsK appears to engage a special interaction with the DNA when encountering a XerCD/*dif* complex, suggesting a structural transition of the FtsK/DNA complex at the time of recombination induction [Bonne et al., 2009]. In addition, FtsK γ alone does not activate *L. lactis* XerS recombination, contrary to the full-length FtsK, either from *E. coli* or from *L. lactis* [Nolivos et al., 2010]. FtsK $\alpha\beta$ may thus play a direct role in activation or potentiate the action of FtsK γ in a way that is still to discover. Whatever the mechanism used, activation leads to a conformation change of the recombination complex that allows XerD to catalyze the strand exchange initiating recombination [Grainge et al., 2011; Zawadzki et al., 2013].

Integrating Chromosome Segregation and Cell Division

The coordinated action of about 15 proteins is necessary for bacterial cell division [Egan and Vollmer, 2013]. These proteins localize at mid-cell and assemble into a multiprotein complex termed the septal ring or divisome. Septation then occurs by constriction of the divisome-

associated membranes. FtsK is amongst the first divisome proteins to localize at mid-cell and its localization is required for the recruitment of other divisome components [Chen and Beckwith, 2001; Wang and Lutkenhaus, 1998; Yu et al., 1998a]. Absence of FtsK-N provokes the formation of long cell filaments without septal constriction [Draper et al., 1998; Wang and Lutkenhaus, 1998]. This phenotype may be suppressed by overproduction of some divisome proteins (FtsA, FtsQ and FtsN), suggesting the main role of FtsK-N in cell division is to stabilize the divisome [Draper et al., 1998; Geissler and Margolin, 2005; Goehring et al., 2007]. However, recent data suggest a specific role of FtsK-N, particularly one of the periplasmic loops, in the control of membrane synthesis [Berezuk et al., 2014]. A role of FtsK in the control of membrane synthesis was also postulated from the phenotype observed upon FtsK depletion in strains where FtsK-C was essential due to replicore unbalance [Lesterlin et al., 2008]. The essentiality and role of FtsK-N is not conserved in all bacteria families, for example none of the two *B. subtilis* FtsK homologues, SpoIIIE and SftA have an essential N-terminal domain [Biller and Burkholder, 2009; Liu et al., 2006]. SpoIIIE have nevertheless been shown to act at different stages of membrane fusion during sporulation [Liu et al., 2006].

While not essential for growth, deletion of all or part of FtsK-L and of FtsK-C also provokes problems of septum formation, as judged by the apparition of cell filaments and cell chains [Bigot et al., 2004; Recchia et al., 1999; Yu et al., 1998b]. These defects cannot be entirely explained by the inactivation of chromosome dimer resolution, indicating that the role of FtsK in cell division is not restricted to FtsK-N [Bigot et al., 2004]. Consistently, a strain deleted for the entire *ftsK* gene and producing an FtsW::FtsK_{179–817} fusion protein that localizes FtsK-L to the division septum is viable, suggesting an important role of the FtsK-L in cell division. The same effect is observed when FtsK-L is fused to other septum-associated proteins, FtsQ or FtsL, but not when it is produced alone as a cytoplasmic protein [Dubarry and Barre, 2010]. Furthermore, two-hybrid experiments have shown that FtsK-L contains at least three subdomains implicated in interactions with other proteins of the septum: FtsQ, FtsZ and FtsI. This strongly suggests that FtsK-L contributes to the assembly, stability and functionality of the septum.

Segregation of bacterial chromosomes involves multiple processes acting at different stages of the cell cycle on specific chromosome regions [for reviews, see Wang et al., 2013]. In *E. coli*, FtsK acts in the region where replication terminates (*ter*), and where the last stages of chro-

mosome segregation occur [Deghorain et al., 2011]. Consistently, FtsK activity is restricted in time and occurs at the onset of septum constriction, as judged by its capacity to induce Xer recombination [Espéli et al., 2003a; Kennedy et al., 2008; Steiner et al., 1999]. The septal localization of FtsK-N and its hexamerization occur at the same time [Bisicchia et al., 2013], confirming that hexamerization triggers FtsK activity and suggesting that FtsK_N participates in hexamerization, directly or via interaction with other components of the divisome.

When replication is completed, two kinds of physical links might persist between sister chromosomes: intercatenation links and chromosome dimers. FtsK controls the removal of these links and couples it with cell division. Intercatenation links are due to imperfect resolution of the DNA topology complexity during replication and are resolved by a dedicated type II topoisomerase, TopoIV, which is temporally and spatially regulated [Espéli et al., 2003b; Bigot and Mariani, 2010]. FtsK interacts with TopoIV and activates it, which may ensure a spatial and temporal regulation of decatenation [Espéli et al., 2003b; Grainge et al., 2007]. Decatenation may also be achieved by successive rounds of XerCD-*dif* recombination [Pérals et al., 2001; Shimokawa et al., 2013].

In *E. coli*, chromosome dimers form by homologous recombination between sister chromosomes during replication (fig. 2). This occurs in about 15% of the replicative cycle during growth in standard laboratory conditions [Pérals et al., 2000; Steiner et al., 1999]. Dimer resolution is a highly integrated process. It depends on the translocation and Xer induction activities of FtsK-C [Capiaux et al., 2002; Pérals et al., 2001], on the coupling of these two activities, but also on the localization and/or hexamerization of FtsK-C via FtsK-N [Capiaux et al., 2002; Nolivos et al., 2010]. Based on genetic data, it has long been proposed that FtsK processes only dimeric chromosomes. However, the recent direct observation of the segregation pattern of the *ter* region strongly suggests it segregates both dimers and monomers [Stouf et al., 2013]. Sister *ter* regions stay together during the whole postreplicative period. This is due to the activity of the MatP protein that recognizes DNA sites specific for the *ter* region and has condensin/cohesin activity [Dupaigne et al., 2012]. In addition, MatP interacts with ZapB, a component of the divisome [Espéli et al., 2012]. Consistently, FtsK specifically acts in this region [Deghorain et al., 2011]. The *ter* region segregates at the onset of cytokinesis, corresponding to the time when FtsK is active, following an *ori* to *dif* progressive and accurate pattern. This pattern does not depend on the presence of chromosome dimers, or on Xer proteins, but depends

on both FtsK and MatP [Stouf et al., 2013]. The current model postulates that FtsK segregates the *ter* region by releasing MatP-dependent cohesion in a progressive manner dictated by KOPS orientation. Consistent with this model, FtsK can dissociate MatP from its binding site in vitro [Graham et al., 2010a]. This model may apply to other bacteria, although the poor conservation of MatP, found only in Enterobacteriaceae and Vibrionaceae, implies that other proteins act to pair the sister *ter* regions in other families of bacteria. Special situations may be found in some bacterial families. In the case of multiple chromosomes, each chromosome appears to be processed by FtsK, as shown in the case of *V. cholerae* [Val et al., 2008]. The case of multiple FtsK paralogues is more puzzling. In *B. subtilis*, SftA and SpoIIIE play distinct roles in chromosome segregation during vegetative growth [Biller and Burkholder, 2009; Kaimer et al., 2009]. SftA may act during all division events, whereas SpoIIIE would act at a later stage of cell division only in the case DNA is still entrapped in the septum. However, both translocases appear involved in the control of chromosome dimer resolution, raising the possibility that dimers could be resolved at different times and following different patterns [Kaimer and Graumann, 2011]. Whether or not this happens in *E. coli* and a single translocase can act at both stages remains to be established.

Conclusion

FtsK is almost ubiquitous in bacteria. Data from model bacteria indicate that it is the main actor of the last steps of chromosome segregation and couples these steps to cell division, acting as a crucial checkpoint in the bacterial cell cycle. Some functions of this multidomain protein differ between bacterial families. For example, the requirement of FtsK-N for cell division and its role are poorly conserved. It is also not clear at present if mechanistic details such as the ways FtsK loads onto the DNA or activates Xer recombination are strictly conserved or not. These activities may have evolved to adapt to different ways of life, for instance to support sporulation. However, KOPS-directed translocation appears strictly conserved and co-evolved with the replicore organization of bacterial chromosomes. This activity allows FtsK to process chromosomes in an oriented manner and to accurately locate the last steps of segregation to the *dif* site, which in this regard can be considered as the end of circular chromosomes.

Acknowledgments

Research in the Cornet's teams is funded by the CNRS, University Paul Sabatier, ANR contracts BLAN-1327-01, the FEDER Midi-Pyrénées and the ARC. F.F. was supported by a fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

References

- Altschul SF, Lipman DJ: Protein database searches for multiple alignments. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:5509–5513.
- Aravind L, Anantharaman V, Balaji S, Babu MM, Iyer LM: The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol Rev* 2005;29:231–262.
- Aussel L, Barre F-X, Aroyo M, Stasiak A, Stasiak AZ, Sherratt D: FtsK is a DNA motor protein that activates chromosome dimer resolution by switching the catalytic state of the XerC and XerD recombinases. *Cell* 2002;108:195–205.
- Bath J, Wu LJ, Errington J, Wang JC: Role of *Bacillus subtilis* SpoIIIE in DNA transport across the mother cell-prespore division septum. *Science* 2000;290:995–997.
- Becker EC, Pogliano K: Cell-specific SpoIIIE assembly and DNA translocation polarity are dictated by chromosome orientation. *Mol Microbiol* 2007;66:1066–1079.
- Begg KJ, Dewar SJ, Donachie WD: A new *Escherichia coli* cell division gene, *ftsK*. *J Bacteriol* 1995;177:6211–6222.
- Berezuk AM, Goodyear M, Khursigara CM: Site-directed fluorescence labeling reveals a revised n-terminal membrane topology and functional periplasmic residues in the *Escherichia coli* cell division protein FtsK. *J Biol Chem* 2014;289:23287–23301.
- Besprozvannaya M, Pivorunas VL, Feldman Z, Burton BM: SpoIIIE protein achieves directional DNA translocation through allosteric regulation of ATPase activity by an accessory domain. *J Biol Chem* 2013;288:28962–28974.
- Bigot S, Corre J, Louarn J-M, Cornet F, Barre F-X: FtsK activities in Xer recombination, DNA mobilization and cell division involve overlapping and separate domains of the protein: structural and functional analysis of FtsK. *Mol Microbiol* 2004;54:876–886.
- Bigot S, Mariani KJ: DNA chirality-dependent stimulation of topoisomerase IV activity by the C-terminal AAA+ domain of FtsK. *Nucleic Acids Res* 2010;38:3031–3040.
- Bigot S, Saleh OA, Cornet F, Allemand J-F, Barre F: Oriented loading of FtsK on KOPS. *Nat Struct Mol Biol* 2006;13:1026–1028.
- Bigot S, Saleh OA, Lesterlin C, Pages C, El Karoui M, Dennis C, Grigoriev M, Allemand J-F, Barre F-X, Cornet F: KOPS: DNA motifs that control *E. coli* chromosome segregation by orienting the FtsK translocase. *EMBO J* 2005;24:3770–3780.
- Bigot S, Sivanathan V, Possoz C, Barre F-X, Cornet F: FtsK, a literate chromosome segregation machine. *Mol Microbiol* 2007;64:1434–1441.
- Biller SJ, Burkholder WF: The *Bacillus subtilis* SftA (YtpS) and SpoIIIE DNA translocases play distinct roles in growing cells to ensure faithful chromosome partitioning. *Mol Microbiol* 2009;74:790–809.
- Bisicchia P, Steel B, Mariam Debela MH, Lowe J, Sherratt D: The N-terminal membrane-spanning domain of the *Escherichia coli* DNA translocase FtsK hexamerizes at midcell. *mBio* 2013;4:e00800–e00813.
- Blakely G, Colloms S, May G, Burke M, Sherratt D: *Escherichia coli* XerC recombinase is required for chromosomal segregation at cell division. *New Biol* 1991;3:789–798.

- Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, et al: The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 1997;277:1453–1462.
- Bonne L, Bigot S, Chevalier F, Allemand J-F, Barre F-X: Asymmetric DNA requirements in Xer recombination activation by FtsK. *Nucleic Acids Res* 2009;37:2371–2380.
- Campo N, Dias MJ, Davaeran-Mingot M-L, Ritzenthaler P, Le Bourgeois P: Chromosomal constraints in Gram-positive bacteria revealed by artificial inversions. *Mol Microbiol* 2004;51:511–522.
- Capioux H, Lesterlin C, Pérals K, Louarn JM, Cornet F: A dual role for the FtsK protein in *Escherichia coli* chromosome segregation. *EMBO Rep* 2002;3:532–536.
- Carnoy C, Roten C-A: The dif/Xer recombination systems in Proteobacteria. *PLoS One* 2009;4:e6531.
- Cattoni DI, Chara O, Godefroy C, Margeat E, Trigueros S, Milhiet P-E, Nölmann M: SpoIIIE mechanism of directional translocation involves target search coupled to sequence-dependent motor stimulation. *EMBO Rep* 2013;14:473–479.
- Cattoni DI, Thakur S, Godefroy C, Le Gall A, Lai-Kee-Him J, Milhiet P-E, Bron P, Nölmann M: Structure and DNA-binding properties of the *Bacillus subtilis* SpoIIIE DNA translocase revealed by single-molecule and electron microscopies. *Nucleic Acids Res* 2014;42:2624–2636.
- Chen JC, Beckwith J: FtsQ, FtsL and FtsI require FtsK, but not FtsN, for co-localization with FtsZ during *Escherichia coli* cell division. *Mol Microbiol* 2001;42:395–413.
- Clerget M: Site-specific recombination promoted by a short DNA segment of plasmid R1 and by a homologous segment in the terminus region of the *Escherichia coli* chromosome. *New Biol* 1991;3:780–788.
- Cornet F, Louarn J, Patte J, Louarn JM: Restriction of the activity of the recombination site dif to a small zone of the *Escherichia coli* chromosome. *Genes Dev* 1996;10:1152–1161.
- Cortez D, Quevillon-Cheruel S, Gribaldo S, Desnoues N, Sezonov G, Forterre P, Serre M-C: Evidence for a Xer/dif system for chromosome resolution in archaea. *PLoS Genet* 2010;6:e1001166.
- Cox MM: Regulation of bacterial RecA protein function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2007;42:41–63.
- Crozat E, Grainge I: FtsK DNA translocase: the fast motor that knows where it's going. *Chem-biochem Eur J Chem Biol* 2010;11:2232–2243.
- Crozat E, Meglio A, Allemand J-F, Chivers CE, Howarth M, Vénien-Bryan C, Grainge I, Sherratt DJ: Separating speed and ability to displace roadblocks during DNA translocation by FtsK. *EMBO J* 2010;29:1423–1433.
- De-Donatis GM, Zhao Z, Wang S, Huang LP, Schwartz C, Tsodikov OV, Zhang H, Haque F, Guo P: Finding of widespread viral and bacterial revolution dsDNA translocation motors distinct from rotation motors by channel chirality and size. *Cell Biosci* 2014;4:30.
- Deghorain M, Pagès C, Meile J-C, Stouf M, Capioux H, Mercier R, Lesterlin C, Hallet B, Cornet F: A defined terminal region of the *E. coli* chromosome shows late segregation and high FtsK activity. *PLoS One* 2011;6:e22164.
- Diagne CT, Salhi M, Crozat E, Salome L, Cornet F, Rousseau P, Tardin C: TPM analyses reveal that FtsK contributes both to the assembly and the activation of the XerCD-dif recombination synapse. *Nucleic Acids Res* 2014;42:1721–1732.
- Draper GC, McLennan N, Begg K, Masters M, Donachie WD: Only the N-terminal domain of FtsK functions in cell division. *J Bacteriol* 1998;180:4621–4627.
- Dubarry N, Barre F-X: Fully efficient chromosome dimer resolution in *Escherichia coli* cells lacking the integral membrane domain of FtsK. *EMBO J* 2010;29:597–605.
- Dubarry N, Possoz C, Barre F-X: Multiple regions along the *Escherichia coli* FtsK protein are implicated in cell division: role of *E. coli* FtsK in cell division. *Mol Microbiol* 2010;78:1088–1100.
- Duggin IG, Dubarry N, Bell SD: Replication termination and chromosome dimer resolution in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *EMBO J* 2011;30:145–153.
- Dupaigne P, Tonthat NK, Espéli O, Whitfill T, Boccard F, Schumacher MA: Molecular basis for a protein-mediated DNA-bridging mechanism that functions in condensation of the *E. coli* chromosome. *Mol Cell* 2012;48:560–571.
- Egan AJF, Vollmer W: The physiology of bacterial cell division: Bacterial cell division. *Ann NY Acad Sci* 2013;1277:8–28.
- Eisen JA, Heidelberg JF, White O, Salzberg SL: Evidence for symmetric chromosomal inversions around the replication origin in bacteria. *Genome Biol* 2000;1:RESEARCH0011.
- Enemark EJ, Joshua-Tor L: On helicases and other motor proteins. *Curr Opin Struct Biol* 2008;18:243–257.
- Esnault E, Valens M, Espéli O, Boccard F: Chromosome structuring limits genome plasticity in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* 2007;3:e226.
- Espéli O, Borne R, Dupaigne P, Thiel A, Gigant E, Mercier R, Boccard F: A MatP-divisome interaction coordinates chromosome segregation with cell division in *E. coli*. *EMBO J* 2012;31:3198–3211.
- Espéli O, Lee C, Hassing H, Mariani KJ: A physical and functional interaction between *Escherichia coli* FtsK and topoisomerase IV. *J Biol Chem* 2003a;278:44639–44644.
- Espéli O, Levine C, Hassing H, Mariani KJ: Temporal regulation of topoisomerase IV activity in *E. coli*. *Mol Cell* 2003b;11:189–201.
- Fiche J-B, Cattoni DI, Diekmann N, Langerak JM, Clerge C, Royer CA, Margeat E, Doan T, Nölmann M: Recruitment, assembly, and molecular architecture of the SpoIIIE DNA pump revealed by superresolution microscopy. *PLoS Biol* 2013;11:e1001557.
- Gajiwala KS, Burley SK: Winged helix proteins. *Curr Opin Struct Biol* 2000;10:110–116.
- Geissler B, Margolin W: Evidence for functional overlap among multiple bacterial cell division proteins: compensating for the loss of FtsK. *Mol Microbiol* 2005;58:596–612.
- Goehring NW, Robichon C, Beckwith J: Role for the nonessential N terminus of FtsN in division assembly. *J Bacteriol* 2007;189:646–649.
- Graham JE, Sherratt DJ, Szczelkun MD: Sequence-specific assembly of FtsK hexamers establishes directional translocation on DNA. *Proc Natl Acad Sci* 2010b;107:20263–20268.
- Graham JE, Sivanathan V, Sherratt DJ, Arciszewska LK: FtsK translocation on DNA stops at XerCD-dif. *Nucleic Acids Res* 2010a;38:72–81.
- Grainge I: FtsK – a bacterial cell division checkpoint? FtsK: a cell division checkpoint? *Mol Microbiol* 2010;78:1055–1057.
- Grainge I, Bregu M, Vazquez M, Sivanathan V, Ip SC, Sherratt DJ: Unlinking chromosome catenanes in vivo by site-specific recombination. *EMBO J* 2007;26:4228–4238.
- Grainge I, Lesterlin C, Sherratt DJ: Activation of XerCD-dif recombination by the FtsK DNA translocase. *Nucleic Acids Res* 2011;39:5140–5148.
- Hendrickson H, Lawrence JG: Selection for chromosome architecture in bacteria. *J Mol Evol* 2006;62:615–629.
- Hopkins BB, Paull TT: The *P. furiosus* mre11/rad50 complex promotes 5' strand resection at a DNA double-strand break. *Cell* 2008;135:250–260.
- Iyer LM: Comparative genomics of the FtsK-HerA superfamily of pumping ATPases: implications for the origins of chromosome segregation, cell division and viral capsid packaging. *Nucleic Acids Res* 2004;32:5260–5279.
- Kaimer C, González-Pastor JE, Graumann PL: SpoIIIE and a novel type of DNA translocase, SftA, couple chromosome segregation with cell division in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 2009;74:810–825.
- Kaimer C, Graumann PL: Players between the worlds: multifunctional DNA translocases. *Curr Opin Microbiol* 2011;14:719–725.
- Kaimer C, Schenk K, Graumann PL: Two DNA translocases synergistically affect chromosome dimer resolution in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 2011;193:1334–1340.
- Kataoka M, Seki T, Yoshida T: Five genes involved in self-transmission of pSN22, a *Streptomyces* plasmid. *J Bacteriol* 1991;173:4220–4228.
- Kendall KJ, Cohen SN: Plasmid transfer in *Streptomyces lividans*: identification of a kil-kor system associated with the transfer region of pIJ101. *J Bacteriol* 1987;169:4177–4183.
- Kennedy SP, Chevalier F, Barre F-X: Delayed activation of Xer recombination at dif by FtsK during septum assembly in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2008;68:1018–1028.
- Kono N, Arakawa K, Tomita M: Comprehensive prediction of chromosome dimer resolution sites in bacterial genomes. *BMC Genomics* 2011;12:19.

- Kuempel PL, Henson JM, Dircks L, Tecklenburg M, Lim DF: dif, a recA-independent recombination site in the terminus region of the chromosome of *Escherichia coli*. *New Biol* 1991;3: 799–811.
- Kuempel P, Høgaard A, Nielsen M, Nagappan O, Tecklenburg M: Use of a transposon (Tndif) to obtain suppressing and nonsuppressing insertions of the dif resolvase site of *Escherichia coli*. *Genes Dev* 1996;10:1162–1171.
- Kumar R, Grubmüller H: Elastic properties and heterogeneous stiffness of the phi29 motor connector channel. *Biophys J* 2014;106:1338–1348.
- Le Bourgeois P, Bugarel M, Campo N, Daveran-Mingot M-L, Labonté J, Lanfranchi D, Lautier T, Pagès C, Ritzenthaler P: The unconventional Xer recombination machinery of *Streptococcus/Lactococcus*. *PLoS Genet* 2007;3:e117.
- Lee JY, Finkelstein IJ, Arciszewska LK, Sherratt DJ, Greene EC: Single-molecule imaging of FtsK translocation reveals mechanistic features of protein-protein collisions on DNA. *Mol Cell* 2014;54:832–843.
- Lee JY, Finkelstein IJ, Crozat E, Sherratt DJ, Greene EC: Single-molecule imaging of DNA curtains reveals mechanisms of KOPS sequence targeting by the DNA translocase FtsK. *Proc Natl Acad Sci* 2012;109:6531–6536.
- Leslie NR, Sherratt DJ: Site-specific recombination in the replication terminus region of *Escherichia coli*: functional replacement of dif. *EMBO J* 1995;14:1561–1570.
- Lesterlin C, Barre F-X, Cornet F: Genetic recombination and the cell cycle: what we have learned from chromosome dimers: genetic recombination and the cell cycle. *Mol Microbiol* 2004;54:1151–1160.
- Lesterlin C, Mercier R, Boccard F, Barre F-X, Cornet F: Roles for replicores and macrodomains in segregation of the *Escherichia coli* chromosome. *EMBO Rep* 2005;6:557–562.
- Lesterlin C, Pages C, Dubarry N, Dasgupta S, Cornet F: Asymmetry of chromosome replicores renders the DNA translocase activity of FtsK essential for cell division and cell shape maintenance in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* 2008;4:e1000288.
- Levy O, Ptacin JL, Pease PJ, Gore J, Eisen MB, Bustamante C, Cozzarelli NR: Identification of oligonucleotide sequences that direct the movement of the *Escherichia coli* FtsK translocase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102: 17618–17623.
- Liu N-JL, Dutton RJ, Pogliano K: Evidence that the SpoIIIE DNA translocase participates in membrane fusion during cytokinesis and engulfment. *Mol Microbiol* 2006;59:1097–1113.
- Lobry JR: Asymmetric substitution patterns in the two DNA strands of bacteria. *Mol Biol Evol* 1996;13:660–665.
- Löwe J, Ellonen A, Allen MD, Atkinson C, Sherratt DJ, Grainge I: Molecular mechanism of sequence-directed DNA loading and translocation by FtsK. *Mol Cell* 2008;31:498–509.
- Marquis KA, Burton BM, Nollmann M, Ptacin JL, Bustamante C, Ben-Yehuda S, Rudner DZ: SpoIIIE strips proteins off the DNA during chromosome translocation. *Genes Dev* 2008; 22:1786–1795.
- Massey TH, Mercogliano CP, Yates J, Sherratt DJ, Löwe J: Double-stranded DNA translocation: structure and mechanism of hexameric FtsK. *Mol Cell* 2006;23:457–469.
- Nolivos S, Pages C, Rousseau P, Le Bourgeois P, Cornet F: Are two better than one? Analysis of an FtsK/Xer recombination system that uses a single recombinase. *Nucleic Acids Res* 2010;38:6477–6489.
- Nolivos S, Touzain F, Pages C, Coddeville M, Rousseau P, El Karoui M, Le Bourgeois P, Cornet F: Co-evolution of segregation guide DNA motifs and the FtsK translocase in bacteria: identification of the atypical *Lactococcus lactis* KOPS motif. *Nucleic Acids Res* 2012;40: 5535–5545.
- Pease PJ, Levy O, Cost GJ, Gore J, Ptacin JL, Sherratt DJ, Bustamante C, Cozzarelli NR: Sequence-directed DNA translocation by purified FtsK. *Science* 2005;307:586–590.
- Pérals K, Capioux H, Vincourt JB, Louarn JM, Sherratt DJ, Cornet F: Interplay between recombination, cell division and chromosome structure during chromosome dimer resolution in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2001; 39:904–913.
- Pérals K, Cornet F, Merlet Y, Delon I, Louarn J-M: Functional polarization of the *Escherichia coli* chromosome terminus: the dif site acts in chromosome dimer resolution only when located between long stretches of opposite polarity. *Mol Microbiol* 2000;36:33–43.
- Possoz C, Ribard C, Gagnat J, Pernodet JL, Guérineau M: The integrative element pSAM2 from *Streptomyces*: kinetics and mode of conjugal transfer. *Mol Microbiol* 2001;42:159–166.
- Ptacin JL, Nollmann M, Becker EC, Cozzarelli NR, Pogliano K, Bustamante C: Sequence-directed DNA export guides chromosome translocation during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Nat Struct Mol Biol* 2008;15:485–493.
- Ptacin JL, Nollmann M, Bustamante C, Cozzarelli NR: Identification of the FtsK sequence-recognition domain. *Nat Struct Mol Biol* 2006; 13:1023–1025.
- Recchia GD, Aroyo M, Wolf D, Blakely G, Sherratt DJ: FtsK-dependent and -independent pathways of Xer site-specific recombination. *EMBO J* 1999;18:5724–5734.
- Reuther J, Wohlleben W, Muth G: Modular architecture of the conjugative plasmid pSVH1 from *Streptomyces venezuelae*. *Plasmid* 2006; 55:201–209.
- Rocha EP: Evolutionary patterns in prokaryotic genomes. *Curr Opin Microbiol* 2008;11:454–460.
- Rudner R, Karkas JD, Chargaff E: Separation of microbial deoxyribonucleic acids into complementary strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1969;63:152–159.
- Saleh OA, Bigot S, Barre F-X, Allemand J-F: Analysis of DNA supercoil induction by FtsK indicates translocation without groove-tracking. *Nat Struct Mol Biol* 2005;12:436–440.
- Saleh OA, Pérals C, Barre F-X, Allemand J-F: Fast, DNA-sequence independent translocation by FtsK in a single-molecule experiment. *EMBO J* 2004;23:2430–2439.
- Schwartz C, De Donatis GM, Zhang H, Fang H, Guo P: Revolution rather than rotation of AAA+ hexameric phi29 nanomotor for viral dsDNA packaging without coiling. *Virology* 2013;443:28–39.
- Sharp MD, Pogliano K: Role of cell-specific SpoIIIE assembly in polarity of DNA transfer. *Science* 2002;295:137–139.
- Sherratt DJ, Arciszewska LK, Crozat E, Graham JE, Grainge I: The *Escherichia coli* DNA translocase FtsK. *Biochem Soc Trans* 2010;38:395.
- Shimokawa K, Ishihara K, Grainge I, Sherratt DJ, Vazquez M: FtsK-dependent XerCD-dif recombination unlinks replication catenanes in a stepwise manner. *Proc Natl Acad Sci* 2013; 110:20906–20911.
- Sivanathan V, Allen MD, de Bekker C, Baker R, Arciszewska LK, Freund SM, Bycroft M, Löwe J, Sherratt DJ: The FtsK gamma domain directs oriented DNA translocation by interacting with KOPS. *Nat Struct Mol Biol* 2006;13: 965–972.
- Smokvina T, Boccard F, Pernodet J-L, Friedmann A, Guérineau M: Functional analysis of the *Streptomyces ambifaciens* element pSAM2. *Plasmid* 1991;25:40–52.
- Steiner W, Liu G, Donachie WD, Kuempel P: The cytoplasmic domain of FtsK protein is required for resolution of chromosome dimers. *Mol Microbiol* 1999;31:579–583.
- Stouf M, Meile J-C, Cornet F: FtsK actively segregates sister chromosomes in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci* 2013;110:11157–11162.
- Suyama M, Bork P: Evolution of prokaryotic gene order: genome rearrangements in closely related species. *Trends Genet TIG* 2001;17:10–13.
- Tecklenburg M, Naumer A, Nagappan O, Kuempel P: The dif resolvase locus of the *Escherichia coli* chromosome can be replaced by a 33-bp sequence, but function depends on location. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92: 1352–1356.
- Thomsen ND, Berger JM: Running in reverse: the structural basis for translocation polarity in hexameric helicases. *Cell* 2009;139:523–534.
- Touzain F, Petit M-A, Schbath S, El Karoui M: DNA motifs that sculpt the bacterial chromosome. *Nat Rev Microbiol* 2011;9:15–26.
- Val M-E, Kennedy SP, El Karoui M, Bonné L, Chevalier F, Barre F-X: FtsK-dependent dimer resolution on multiple chromosomes in the pathogen *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet* 2008;4:e1000201.

- Vogelmann J, Ammelburg M, Finger C, Guezguez J, Linke D, Flötenmeyer M, Stierhof Y-D, Wohlleben W, Muth G: Conjugal plasmid transfer in *Streptomyces* resembles bacterial chromosome segregation by FtsK/SpoIIIE. EMBO J 2011;30:2246–2254.
- Wang X, Llopis PM, Rudner DZ: Organization and segregation of bacterial chromosomes. Nat Rev Genet 2013;14:191–203.
- Wang L, Lutkenhaus J: FtsK is an essential cell division protein that is localized to the septum and induced as part of the SOS response. Mol Microbiol 1998;29:731–740.
- Wu LJ, Errington J: *Bacillus subtilis* SpoIIIE protein required for DNA segregation during asymmetric cell division. Science 1994;264:572–575.
- Yardimci H, Wang X, Loveland AB, Tappin I, Rudner DZ, Hurwitz J, van Oijen AM, Walter JC: Bypass of a protein barrier by a replicative DNA helicase. Nature 2012;492:205–209.
- Yates J, Aroyo M, Sherratt DJ, Barre F-X: Species specificity in the activation of Xer recombination at dif by FtsK: control of chromosome dimer resolution. Mol Microbiol 2003;49:241–249.
- Yates J, Zhekov I, Baker R, Eklund B, Sherratt DJ, Arciszewska LK: Dissection of a functional interaction between the DNA translocase, FtsK, and the XerD recombinase. Mol Microbiol 2006;59:1754–1766.
- Yu XC, Tran AH, Sun Q, Margolin W: Localization of cell division protein FtsK to the *Escherichia coli* septum and identification of a potential N-terminal targeting domain. J Bacteriol 1998a;180:1296–1304.
- Yu XC, Weihe EK, Margolin W: Role of the C terminus of FtsK in *Escherichia coli* chromosome segregation. J Bacteriol 1998b;180:6424–6428.
- Zawadzki P, May PFJ, Baker RA, Pinkney JNM, Kapanidis AN, Sherratt DJ, Arciszewska LK: Conformational transitions during FtsK translocase activation of individual XerCD-dif recombination complexes. Proc Natl Acad Sci 2013;110:17302–17307.

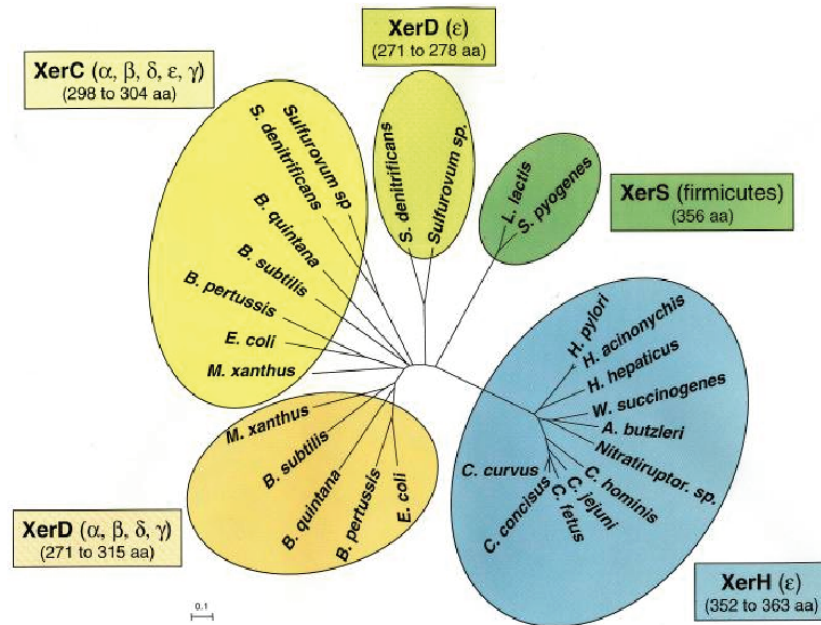
b- Nouvelles données sur l'interaction XerCD/dif/FtsK

Deux études récentes sont parues, après la publication de cette revue. Elles utilisent des techniques de molécules uniques comme le TFM (Tethered Fluorophore Motion) couplé au FRET (Förster Resonance Energy Transfer) (May et al., 2015) ou encore de la microscopie en TIRF (Total Internal reflection Fluorescence) (Lee et al., 2014). Ces deux articles, ensemble, apportent plus de précisions sur le fonctionnement de FtsK. En effet, lorsque FtsK, sous forme hexamérique, arrive sur un complexe XerCD/*dif*, synapsé ou non, elle fait une pause d'environ 0,5 s (Lee et al., 2014) (May et al., 2015). Après cette pause, FtsK se dissocie, sans reverser (May et al., 2015). Cette pause de 0,5 s est spécifique de l'interaction entre FtsK et un complexe XerCD/*dif*. Ce temps court ne semble pas permettre plusieurs activations successives de la réaction de recombinaison par FtsK. Cette caractéristique est en désaccord avec l'idée que le système XerCD/*dif*/FtsK est capable de résoudre les liens d'intercaténation du chromosome par recombinaisons successives (Ip et al., 2003). Étonnament, FtsK n'active pas obligatoirement la recombinaison lorsqu'elle arrive sur une synapse XerCD/*dif* pré-formée. En effet, *in vitro*, en proportions équitables FtsK va activer, ou non, la réaction de recombinaison (May et al., 2015). Si FtsK a le même comportement *in vivo*, face à une synapse, ce phénomène pourrait correspondre à un mécanisme de régulation pour assurer la directionnalité de la recombinaison pour résoudre les dimères de chromosomes et non en produire. En effet, si FtsK rencontre une synapse formée entre deux chromatides soeurs monomériques, elle n'activerait pas la recombinaison.

3. Systèmes alternatifs de gestion des dimères de chromosome

a- Les systèmes à une seule recombinase

A



B

<i>difH_{cons}</i>	ATCTTTCCGAAAAA TAGAAAGGCTTTTT	CTR TAA GAR ATT	TTTTCTTGAAA AAAAGAACTTT
<i>difSL_{cons}</i>	TTTGTATTGAAAAA AAACATAACTTTTT	CTATAA GATATT	TTTTCAAACCTT AAAAGTTTGAA

C

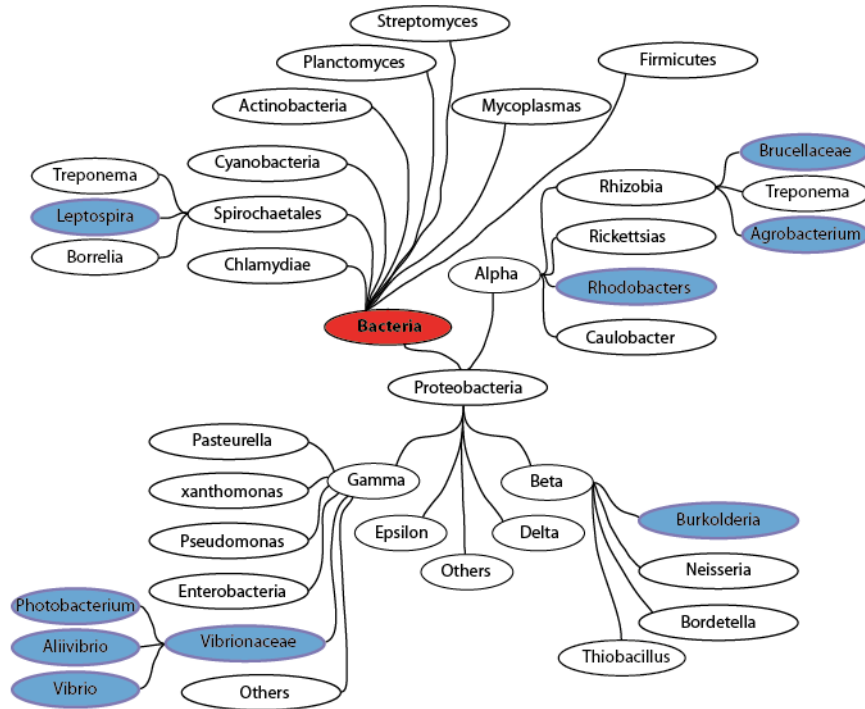
<i>difTh_{cons}</i>	TTTNGATATAA AAANCTATATT	TCNGCC AGNCGG	TTATATCTAAA AATATAGATTT
-----------------------------	----------------------------	------------------	----------------------------

Figure 5 : Systèmes de recombinaison Xer à une ou deux recombinases à tyrosine. **A** : Analyse phylogénétique des recombinases XerC, XerD, XerH et XerS appartenant aux protéobactéries. Les espèces et les taxons auxquels elles appartiennent sont représentés. Les tailles en acides aminés sont indiquées en dessous du nom des recombinases. Cet arbre phylogénétique est adapté de l'étude de Carnoy and Roten, 2009. **B** : Séquences des sites de recombinaison *dif_H* et *dif_{SL}*. Ces sites ont une longueur de 31 pb. Les bras de fixation ont des longueurs en pb différentes, le bras gauche (gris pâle) est plus long que le bras droit (gris foncé). Cette asymétrie est importante pour la formation des complexes XerS/*dif_{SL}*. XerS se fixe préférentiellement sur le bras gauche et coopérativement sur le bras droit. **C** : Séquence du site *dif_{Th}*, ce site correspond au site de recombinaison des Archées.

Le système de résolution de dimères de chromosome bactérien impliquant XerC et XerD est extrêmement conservé (Carnoy and Roten, 2009). Toutefois, certaines bactéries utilisent un système à une seule recombinase (Figure 5A). C'est le cas pour les Firmicutes comme les *Lactococci* et les *Streptococci* ou certaines ϵ -proteobacteries comme *Helicobacter spp.* et *Campylobacter spp.* Les systèmes XerS/*dif_{SL}* et XerH/*dif_H*, respectivement, sont fonctionnels dans ces deux groupes de bactéries (Debowski et al., 2012a) (Debowski et al., 2012b) (Le Bourgeois et al., 2007) (Figure 5A). Le mode de fixation de XerS sur le site *dif_{SL}* est similaire au mode de fixation de XerCD sur *dif*. (Figure 5B). Le contrôle de FtsK est aussi le même entre XerS/*dif_{SL}* et XerCD/*dif*. L'activation XerS/*dif_{SL}* nécessite l'activité de translocation de FtsK et la présence de son domaine γ . Les données sur le système XerH/*dif_H* ne permettent pas de conclusions claires sur l'implication de FtsK dans son activation. Toutefois, il semblerait que l'homologue de FtsK retrouvé chez *Helicobacter pylori* soit nécessaire à la recombinaison catalysée par XerH (Debowski et al., 2012b). Que ce soit pour XerS/*dif_{SL}* ou pour XerH/*dif_H*, un certain taux de recombinaison basal est toujours observé en absence de FtsK, au contraire du système XerCD/*dif* d'*E.coli*. Ce phénomène pourrait être la conséquence d'une structure différente de la synapse de recombinaison correspondant à un homotétramère sur *dif_H* et *dif_{SL}*, ou de l'intervention d'une protéine activatrice autre que FtsK (Nolivos et al., 2010) (Debowski et al., 2012b).

Un autre système de résolution de dimères de chromosome à une seule recombinase existe chez les Archées. En effet, bien que les Archées aient une machinerie de réplication et de réparation de l'ADN proche de celle des Eucaryotes, elles possèdent aussi un système de résolution Xer/*dif* pour maintenir leur chromosome circulaire en état monomérique. Une analyse globale d'une vingtaine de génomes d'Archées disponibles suggère qu'elles ne possèdent qu'une seule recombinase appelée XerA (Cortez et al., 2010). Les protéines XerA de *Pyrococcus abyssi* et de *Sulfolobus solfataricus* ont été caractérisées biochimiquement. Toutes deux disposent d'une activité de recombinaison au niveau de leur site *dif* respectif sans l'aide d'aucune protéine accessoire (Figure 5C) (Serre et al., 2013) (Duggin et al., 2011). La protéine homologue à FtsK chez les Archées : HerA n'est donc pas requise pour activer la recombinaison catalysée par XerA (Rzechorzek et al., 2014) (*cf.* B I 2a : revue FtsK). Cette caractéristique de XerA est en accord avec le fait que HerA n'ait pas de domaine γ .

A



B

	<i>XerC</i> <i>dif</i>	<i>cent</i> <i>dif</i>	<i>XerD</i> <i>dif</i>
<i>dif_{VC1}</i>	AGTGCGTATTA TCACGCATAAT	TGTATG ACATAC	TTATGTTAAAT AATAACAATTTA
<i>dif_{VC2}</i>	AaTGCGCATTA TtACGCGTAAT	cGTgcG gCAcgC	TTATGTTAAAT AATAACAATTTA

Figure 6 : Les bactéries multichromosomiques. **A** : Représentation de la phylogénie des bactéries multichromosomiques. La présence d'un second chromosome chez un phyla ou espèce bactérienne est représentée en bleu. **B** : Sites de recombinaison du chromosome primaire et secondaire de *Vibrio cholerae*, composés d'un bras de fixation pour XerC (*dif^{XerC}*), d'un bras de fixation pour XerD (*dif^{XerD}*) et d'une région centrale (*dif^{cent}*). Les différences entre les deux sites sont représentées par les paires de bases en minuscule.





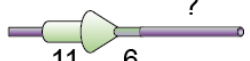
b- Résolution des dimères chez les bactéries multichromosomiques

La plupart des bactéries ont un chromosome unique, mais approximativement 10% des génomes bactériens comportent un second chromosome (Figure 6A) (pour revue: Val et al., 2014a). La majorité des travaux portant sur les bactéries à deux chromosomes ont été faits chez *Vibrio cholerae* qui présente un gène codant XerC, un codant XerD et un codant FtsK (Val et al., 2008). Cette bactérie doit donc pouvoir, avec un seul système XerCD/FtsK, résoudre les problèmes de dimérisation de ses deux chromosomes. Le système de *V.cholerae* fonctionne comme celui de *E.coli*. Le point clé est la différence de séquence des deux sites *dif* (*dif_{VC1}* et *dif_{VC2}*) portés par les deux chromosomes (Figure 6B). Les bras de fixation pour XerD et XerC sont conservés entre les deux sites *dif*. La principale différence se trouve dans la région centrale: la région centrale de *dif_{VC1}* est extrêmement conservée en comparaison avec les sites *dif* des autres bactéries, alors que la région centrale du site *dif_{VC2}* est différente (pour revue: Midonet and Barre, 2014) (Figure 6B). Cette caractéristique est retrouvée dans la plupart des autres bactéries multichromosomiques. Une explication possible pour cette différence est l'existence d'une pression de sélection pour empêcher les événements de recombinaison entre les deux chromosomes (Kono et al., 2011) (Val et al., 2014b).

4. Détournement du système de XerCD/*dif*

Le système de recombinaison spécifique de site impliquant des recombinases à tyrosine est aussi impliqué dans les transferts horizontaux de gènes. Dans ce cas, le système de recombinaison catalyse l'intégration et l'excision des éléments génétiques mobiles dans le génome de la bactérie hôte. Plusieurs mécanismes ont été décrits, faisant intervenir une recombinase unique ou deux, avec ou sans facteurs nucléiques ou protéiques accessoires. De ces études peuvent se différencier deux grands types d'éléments génétiques mobiles utilisant la recombinaison spécifique de site; ceux qui codent pour leur propre recombinase et ceux qui utilisent les recombinases de leur hôte

A

	<i>XerC</i> <i>dif</i>	<i>cent</i> <i>dif</i>	<i>XerD</i> <i>dif</i>	
<i>dif_{VC1}</i>	AGTGCGCATTA TCACGCGTAAT	TGTATG ACATAC	TTATGTTAAAT AATACAATTTA	
<i>attP</i> <i>CTX type</i>	AGTGC g tATTA TCACG C aTAAT	Tgt  CA AtgcgGT	TTATGTT g aGG AATACAAT g CC	
<i>attP</i> <i>VGJ type</i>	A c T t CGCATTA T g A a GCGTAAT	TGTCGGC ACAGCCG	TTATGGTAAAA AATACCATTTT	
<i>attP</i> <i>TLC type</i>	AGTGCGCATTA TCACGCGTAAT	TGTATG ACATAC	T aga G aa A gt g A t c t C t t T c a c	

B

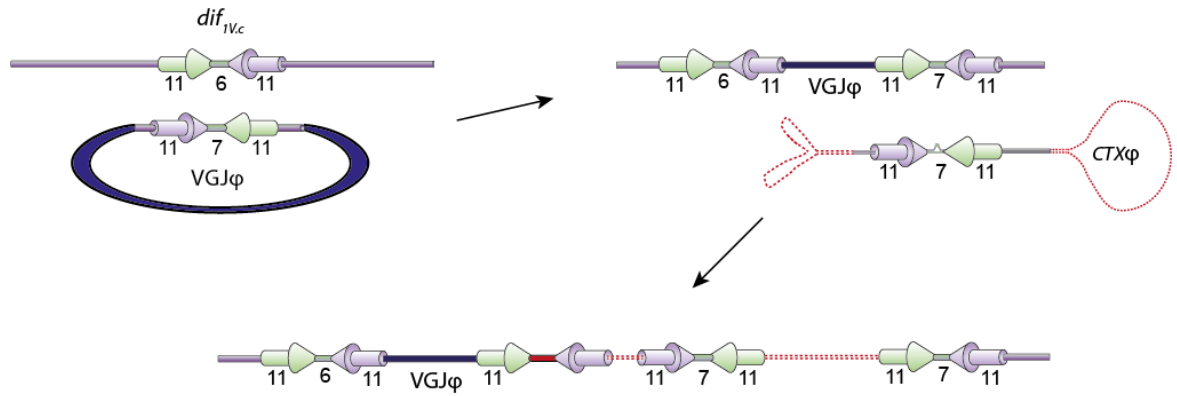


Figure 7 : Les trois classes d'IMEXs définies par le site de recombinaison de leurs paradigmes. **A** : Séquences du site *dif_{VC1}* (cf Figure 5) et des sites *attP* (attachement phage) des trois classes d'IMEXs : classe I : CTX, classe II : VGJ et classe III : TLC. Les divergences de séquences sont représentées par les paires de bases en minuscule et gras. Les sites du paradigme de chaque classe d'IMEXs sont schématisés : la flèche verte correspond au bras de fixation pour XerC et la flèche violette correspond au bras de fixation pour XerD. La longueur en paires de bases est indiquée en dessous du schéma. Le point d'interrogation schématise l'absence du bras de fixation pour XerD du bactériophage TLC. **B** : Intégration concertée des bactériophages (φ) VGJ et CTX et reconstruction d'un site *dif_{VC1}* fonctionnel. Le bactériophage VGJ s'intègre en premier, entraîne la formation d'un site *dif_{VC1}* fonctionnel et d'un site à 7 pb centrales qui permet l'intégration du bactériophage CTX. L'ADN de *V.cholerae* est représenté par un cylindre violet clair, l'ADN double brins de VGJ est représenté par un trait épais bleu et l'ADN simple brin de CTX est représenté par un trait en pointillés rouge.

(pour revues : Das et al., 2013, Wood and Gardner, 2015, Poulter and Butler, 2015). Bien que les éléments génétiques mobiles codant pour leur propre recombinase ont historiquement une importance certaine, je ne développerai que les éléments génétiques mobiles qui détournent les recombinases de leur hôte.

a-Présentation des IMEXs

Certains éléments génétiques mobiles intégratifs ne codent pas pour leur propre recombinase mais utilisent la machinerie Xer de leur hôte pour catalyser leur intégration/excision au site *dif* et leur mobilité est dépendante de XerC et XerD. Ces éléments sont appelés IMEXs pour Integrative Mobile Elements exploiting Xer (Das et al., 2013). Les IMEXs sont retrouvés dans le génome d'un grand nombre de bactéries comme chez les Entérobactéries (*E.coli* et *Yersinia pestis*), les Vibrionaceae (*Vibrio cholerae*) ou encore les Neisseriaceae (*Neisseria gonorrhoeae* et *Neisseria meningitidis*). Premièrement découvert pour leur implication dans la conversion pathogène de *V. cholerae* (Das et al., 2013), ils sont divisés en trois classes selon le type de site de recombinaison qu'ils portent (*attP*) (Figure 7 A). Ces trois classes portent le nom de leurs représentants les plus étudiés chez *V. cholerae* : CTX, VGJ et TLC (Das et al., 2013) (Midonet and Barre, 2014) (Figure 7 A).

La grande majorité des IMEXs identifiés correspondent à des bactériophages filamenteux. Dans chaque cas, un site *dif* chromosomique fonctionnel est recréé après l'intégration du génome viral. La formation d'un site *dif* fonctionnel après l'intégration est important pour la résolution des dimères de chromosome et la survie des bactéries. Ce nouveau site *dif* est composé du bras de fixation de XerD et de la région centrale du site chromosomique pré-existant et du bras de fixation de XerC du site *attP* (Figure 7 B). Ceci implique que le bras de fixation pour XerC soit conservé entre le site *dif* chromosomique et les sites de recombinaison des IMEXs (Figure 7 A et B). De plus, une étude des génomes d'isolats cliniques et environnementaux d'un grand nombre de *V. cholerae* montre que la plupart portent plusieurs IMEXs intégrés, suggérant une certaine

interaction des cycles d'intégration/excision des IMEXs entre eux. Toutefois, chaque classe d'IMEXs a développé une stratégie différente pour son intégration et pour assurer sa stabilité dans le génome bactérien (Figure 8).

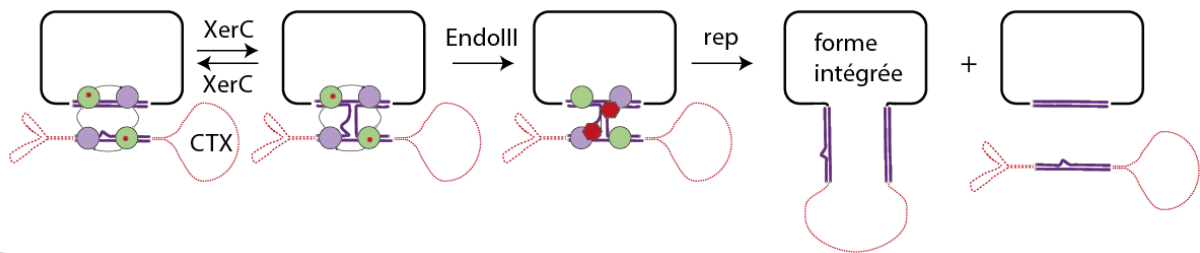
b-Les bactériophages CTX, VGJ et TLC.

L'exemple le mieux décrit est l'IMEX qui porte les éléments cruciaux de la virulence de *V.cholerae* : le bactériophage CTX (Das et al., 2011a). L'ADN double brin de ce bactériophage contient deux sites de recombinaison en orientation inversée, mais aucun des deux ne peut recombiner avec le site chromosomique de *V.cholerae*. Le site *attP_{CTX}* est formé par le repliement de l'ADN viral simple brin. Cet ADN simple brin est généré par un système homologue à la réplication en cercle roulant³ (Figure 7 A et Figure 8 A). L'intégration est catalysée par XerC, qui catalyse le premier échange de brin et forme la jonction de Holliday. Dans cette réaction l'activité catalytique de XerD n'est pas requise, elle y jouerait seulement un rôle structural dans la formation du complexe synaptique de recombinaison. La jonction de Holliday serait résolue par le passage de la fourche de réplication (Das et al., 2010). Comme la jonction de Holliday est formée par un échange de brin catalysé par XerC, la probabilité qu'elle revienne à son état initial est extrêmement forte. Dans le cas de CTX, une protéine de réparation de l'ADN, EndoIII, interviendrait pour stabiliser la jonction de Holliday (Bischerour et al., 2012) (Figure 8 A). Comme le site *attP_{CTX}* est porté par l'ADN simple brin de l'ADN viral, l'intégration de CTX est irréversible. De plus, il existe deux variants majeurs de CTX selon le biotype⁴ de leur hôte. Ces deux variants : le CTX "classique" et le CTX "el tor", ne ciblent pas le même site *dif* chromosomique. Ce phénomène est la conséquence de l'homologie qui existe entre les régions centrales des deux sites impliqués dans la réaction de recombinaison.

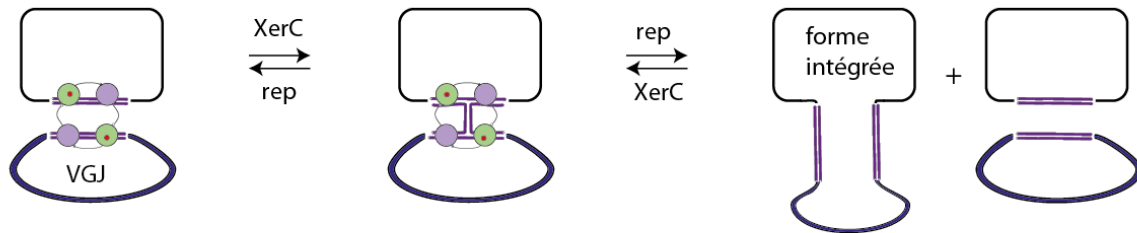
³ La réplication en cercle roulant (rolling circle) est un mécanisme de duplication du matériel génétique souvent utilisé par les plasmides et bactériophages. La réplication est initiée à une origine par une cassure simple brin de l'ADN. Une extrémité 3'OH est libérée et sert d'amorce à l'ADN polymérase. La matrice de la réplication est le brin d'ADN non clivé. Dans le cas du CTX elle permet la production d'un ADN simple brin (+).

⁴ Le biotype correspond à l'ensemble des caractéristiques biochimiques qui définissent une souche bactérienne.

A



B



C

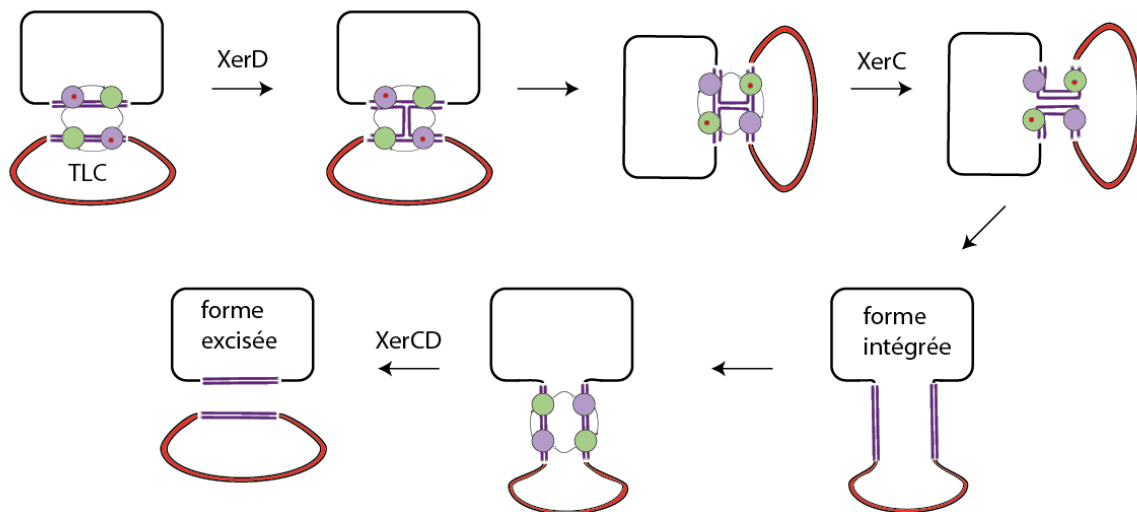


Figure 8 : Diversité des mécanismes d'intégration des IMEXs de classe I : CTX, II : VGJ et III : TLC. Pour l'ensemble des trois schémas, XerC est représentée par un cercle vert, XerD par un cercle violet, les sites de recombinaison par des traits violets et l'ADN de *V.cholerae* est représenté par un trait noir. Les recombinases actives pour la catalyse sont marquées d'un petit cercle rouge. Les formes intégrées des différents IMEXs sont indiquées tout comme les protéines où processus de réplication impliqués dans chaque étape des mécanismes **A** : Intégration irréversible du bactériophage CTX, la représentation de l'ADN de CTX est la même que pour la figure 7, EndoIII est représentée par un hexagone rouge. **B** : Intégration/excision du bactériophage VGJ. La représentation de l'ADN viral est la même que en Figure 7. **C** : Intégration/excision du bactériophage TLC, l'ADN viral est représenté par un trait épais rouge.

Ainsi, le phage CTX "el tor" aura pour cible le site *dif_{VC1}* et n'a pas la capacité de s'intégrer au site *dif_{VC2}*, alors que le phage CTX "classique" s'intègre aux deux sites (Das et al., 2010) (Figure 6 B).

Au contraire de CTX, le site *attP* de VGJ est porté par l'ADN double brin viral. Il présente une région centrale de 7pb non optimale (Figure 7 A). Son intégration résulte d'un premier échange de brin catalysé, là aussi, par XerC. L'intermédiaire branché est certainement résolu par la réplication (Figure 8 B). La différence la plus frappante entre CTX et VGJ se trouve au niveau du mécanisme d'excision. En effet, l'excision de l'ADN viral de VGJ est possible bien que peu fréquente, via un premier échange de brin catalysé par XerC et la résolution de la jonction de Holliday par réplication. Ce mécanisme amène à la formation d'une copie libre de VGJ, d'un chromosome frère sans VGJ et d'un autre chromosome frère sur lequel VGJ est toujours présent (Das et al., 2011b) (Figure 8 B).

L'IMEX dont le mécanisme a été décrit le plus récemment, est le bactériophage TLC, qui utilise le bactériophage VGJ pour favoriser sa dissémination. Le site *att_{TLC}* est retrouvé sous forme double brins tout comme celui de VGJ, mais sa région centrale de 6 pb est homologue à la région centrale du site *dif* chromosomique (Figure 7 A). En revanche, le bras de fixation pour XerD de *att_{TLC}* est extrêmement dégénéré, ce qui en fait un mauvais substrat de fixation pour XerD (Figure 7 A). Concernant le mécanisme d'intégration de TLC, c'est XerD qui catalyse le premier échange de brins et la jonction de Holliday est résolue en produits par un échange de brins catalysé par XerC (Figure 8 C). La réaction d'excision est aussi possible, mais elle se fait à un taux très faible. L'excision de TLC est catalysée par un mécanisme identique à l'intégration (Midonet et al., 2014). Ce mécanisme d'intégration/excision dépendant d'un premier échange de brins catalysé par XerD est une nouveauté. En effet, les autres IMEXs caractérisés utilisent XerC pour catalyser le premier échange de brin. L'intégration et l'excision de TLC ont donc un mécanisme similaire à la résolution d'un dimère de chromosomes. Ces mécanismes, bien que le premier échange de brin soit catalysé par XerD, sont indépendants de la présence de FtsK (Figure 8 C)(Midonet et al., 2014). Or, XerD requiert obligatoirement la présence de FtsK pour catalyser le premier échange de brin (Grainge et al., 2011) (Aussel et al., 2002). Seule, XerD n'est donc pas active. Il serait

donc possible que pour le mécanisme d'intégration/excision de TLC, une protéine activatrice, autre que FtsK, intervienne.

c-Le GGI (Gonococcal Genetic Island)

Bien que la plupart des IMEXs étudiés soient des phages filamenteux, il existe des îlots génomiques qui détournent le système Xer de leur hôte. C'est le cas de l'îlot GGI (gonococcal genetic island) présent chez 80% des souches de *N.gonorrhoeae* (*Ng*) et chez certaines souches de *N. meningitidis* (*Nm*). *Ng* et *Nm* sont des pathogènes humains à la source de maladies sexuellement transmissibles ou de méningites (Woodhams et al., 2012) (Snyder et al., 2005) (Snyder et al., 2004). Chez ces bactéries, la résolution des dimères de chromosomes semble être dépendante d'un système homologue à celui d'*E. coli*. Même si l'implication directe de la présence du GGI dans la pathogénicité des gonocoques n'est pas prouvée, un certain nombre d'informations vont dans ce sens (Dominguez et al., 2011). Chez les gonocoques, le GGI code pour un système de sécrétion de type IV (T4SS). Ce système intervient dans la sécrétion de l'ADN chromosomique, pré-requis aux transferts de gènes dans les populations bactériennes, augmentant la diversité génétique (Figure 9 A). L'échange d'ADN dans une population gonococcale peut aussi faciliter l'apparition de résistance aux antibiotiques (Ramsey et al., 2015) (Pachulec et al., 2014). Le mécanisme de transfert est similaire au système de conjugaison ou au système de transfert Hfr⁵ d'*E.coli*. Le chromosome est clivé par la relaxase TraI à un site unique *oriT* puis transféré sous forme simple brin à travers le T4SS. La différence importante entre le système conjugatif et le système T4SS du GGI est que l'ADN simple brin sécrété par le système du GGI se retrouve libre à l'extérieur de la cellule (Zweig et al., 2014) (Ramsey et al., 2011) (Figure 9 A/B). En plus de son implication dans les échanges de gènes, le GGI peut porter un ou deux gènes (*altA* et *ItgX*) qui codent pour une transglycolase lytique (Figure 9 A). Cette enzyme est impliquée dans le remodelage des peptidoglycanes composant les structures cellulaires

⁵ Le système Hfr (Haute Fréquence de Recombinaison) correspond à un type de conjugaison où le plasmide F conjugatif est intégré au chromosome de la bactérie donneuse (pour revue : Arutyunov and Frost, 2013).

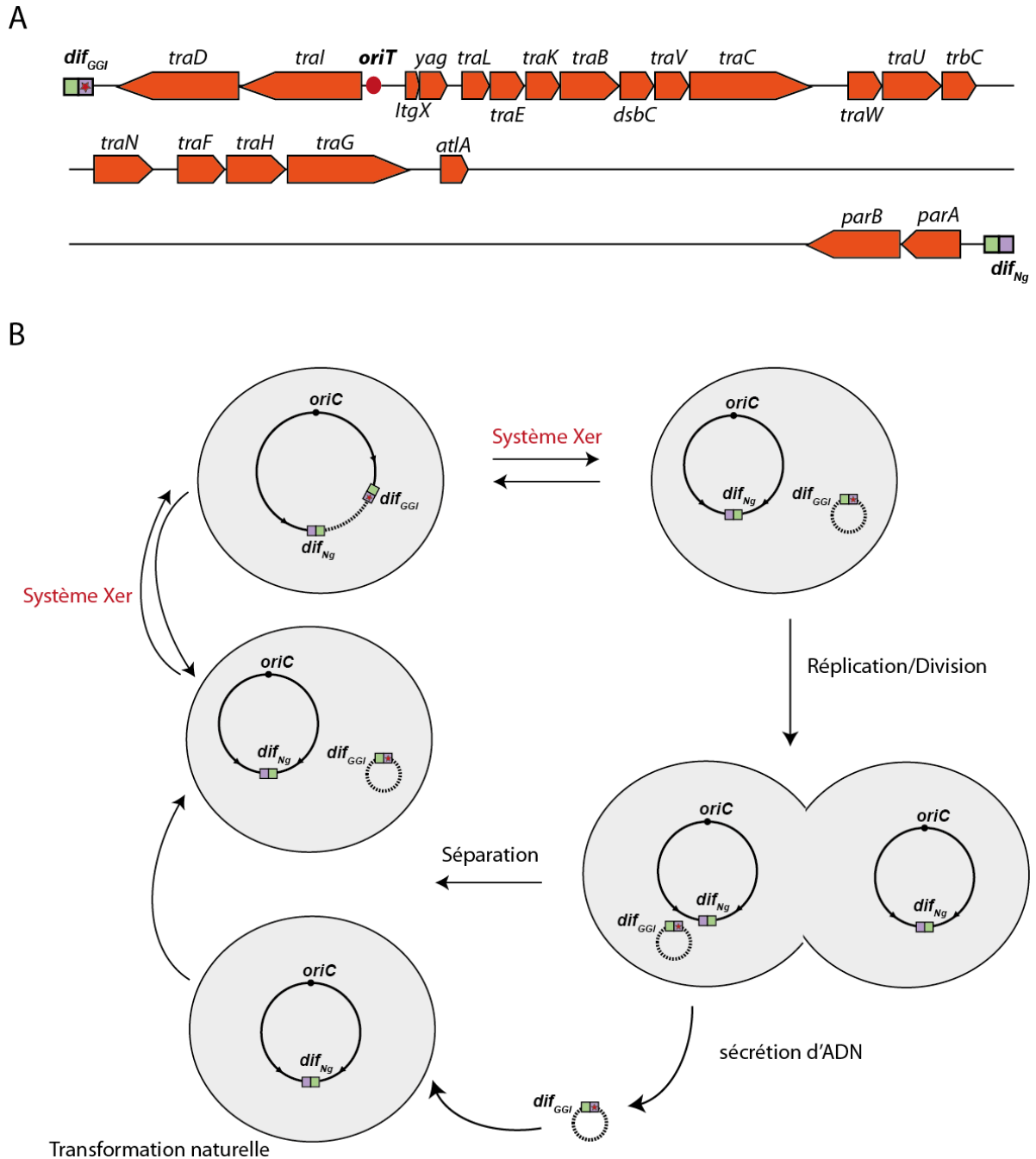


Figure 9 : Le GGI : Gonococcal Genetic Island. **A** : Schématisation simplifiée du GGI, les sites de recombinaison sont représentés par deux carrés verts et violets : le carré vert correspond au bras de fixation pour XerC et le carré violet correspond au bras de fixation pour XerD. Les altérations du bras XerD de *dif_{GGI}* sont notées par une étoile rouge. L'origine de Transfert (*OriT*) est représentée par un cercle rouge. Les gènes, dont la fonction est connue, sont représentés par des flèches oranges dont l'orientation correspond à celle des gènes. Les gènes *tra* correspondent aux gènes impliqués dans le système de sécrétion de type IV. **B** : Schéma du cycle de mobilité du GGI intégré au cycle cellulaire d'un gonocoque. Le GGI est représenté par un trait en pointillés et le chromosome par un trait plein. Les sites *dif_{Ng}*, *dif_{GGI}* et l'origine de réplcation du chromosome (*oriC*) sont annotés. L'intervention du système Xer dans l'intégration et l'excision du GGI est indiquée.

	<i>XerC</i> <i>dif</i>	<i>cent</i> <i>dif</i>	<i>XerD</i> <i>dif</i>
<i>dif</i> _{Ng1,Nm}	AGTTCGCATAA TCAAGCGTATT	TGTATA ACATAT	TTATGTTAAAT AATACAATTTA
<i>dif</i> _{Ng2}	AGTTCGtATAA TCAAGCaTATT	TGTATA ACATAT	TTATGTTAAAT AATACAATTTA
<i>dif</i> _{Nm}	AGTTCGCATAA TCAAGCGTATT	TaTATA AtATAT	TTATGTTAAAT AATACAATTTA
<i>dif</i> _{GGI}	AGTTCGCATAA TCAAGCGTATT	TGTATA ACATAT	TTATGcaTtcT AATACgtAagA
<i>dif</i> _{GGI-1}	AGTTCGCATAA TCAAGCGTATT	TGTATA ACATAT	TagaGTgctgg AtgtCAcgacc
<i>dif</i> _{GGI-2}	AGTTCGCATAA ACAAGCGTATT	TaTATA AtATAT	TTATGcgAAcT AATACgcTTgA

Figure 10 : Séquences des sites de recombinaison retrouvés sur les chromosomes de *Neisseria gonorrhoeae* et *Neisseria meningitidis* et séquences des sites de recombinaison retrouvés sur les différents variants du GGI. Ces sites sont composés d'un bras de fixation pour XerC (*dif^{XerC}*) en vert, d'une région centrale (*dif^{cent}*) et d'un bras de fixation pour XerD (*dif^{XerD}*) en violet. Les divergences du bras de fixation pour XerD des différents sites de recombinaison retrouvés sur les GGIs sont annotées par des minuscules en gras.

comme la paroi cellulaire ou les flagelles. Le clivage des peptidoglycanes par la transglycolase lytique entraîne la formation de monomères ou multimères de peptidoglycanes cytotoxiques qui sont relâchés en quantité importante par les gonococques lors de leur croissance. Ces peptidoglycanes relâchés entraînent, par exemple, la mort des cellules ciliées des trompes de Fallope (Chan et al., 2012) (Cloud and Dillard, 2002).

Le GGI de la souche de *Ng* MS11 est un îlot génomique de 57Kpb inséré au site *dif* chromosomique et est flanqué d'un site *dif* altéré (Figure 9 B) (Dominguez et al., 2011). Comme pour le bactériophage TLC, ce site consiste en un bras de fixation pour XerC, une région centrale homologue au site *dif* chromosomique, et un bras de fixation pour XerD dégénéré (Figure 7 et 10). La comparaison des souches portant ou non le GGI, ainsi que des études fonctionnelles montrent que le GGI s'intègre de manière dépendante de XerCD (Dominguez et al., 2011) (Figure 9 B), ce qui en fait un IMEX. Alors que les mécanismes des IMEXs associés à *V.cholerae* sont décrits dans la littérature (Midonet and Barre, 2014), celui médiant l'intégration et l'excision du GGI est inconnu. La forme extra-chromosomique du GGI peut être détectée, ce qui montre que l'excision est possible mais à une fréquence très basse. Comme cet îlot génomique porte une origine de transfert (*oriT*), sa forme excisée peut être sécrétée et être utilisée, à travers la transformation naturelle, pour être intégrée dans une cellule qui ne porte pas le GGI (Figure 9 A). Il existe huit variants du GGI, de taille et composition en gènes différents, en fonction des souches de *Ng* ou de *Nm* étudiées (Snyder et al., 2005) (Snyder et al., 2004). Ces différents GGI sont retrouvés dans des souches différentes qui présentent parfois des sites de résolution de dimères de chromosomes dont la composition en bases diverge (Figure 10). Toutefois, en comparant les sites portés par le GGI au site de résolution de dimères de chromosome de la souche associée, une caractéristique reste identique. En effet, chaque site de recombinaison porté par le GGI présente un bras de fixation pour XerD altéré. Au minimum le bras de fixation pour Xer est divergent de 3pb en comparaison du site de résolution des dimères de son hôte (Snyder et al., 2005) (Snyder et al., 2004) (Figure 10). Il semblerait donc que cette caractéristique soit un élément essentiel à la "vie" du GGI. Aucune information mécanistique de l'effet de ces mutations sur le mécanisme de recombinaison spécifique de site Xer n'est pourtant disponible.

II-Résultats

1. FtsK stabilise la forme intra-chromosomique du GGI en inhibant la recombinaison qui catalyse son excision.

a- Résumé de la publication

Le système de résolution de dimères de chromosome implique plusieurs intervenants: un site de recombinaison appelé *dif*, deux recombinases à tyrosine XerC et XerD et une protéine activatrice FtsK. Le site de recombinaison correspond au site spécifique de fixation des recombinases, sur lequel elles vont catalyser le double échange de brins. La conservation des bases qui composent ce site est importante pour les deux activités des recombinases: fixation et catalyse. La protéine FtsK est une rapide et puissante translocase à ADN qui couple la ségrégation des chromosomes à la division cellulaire. Elle est composée de plusieurs domaines dont le domaine C-terminal qui contient le moteur de la translocation ainsi que le sous-domaine γ qui active la recombinaison par contact avec XerD. Le système Xer est finement contrôlé pour éviter tout effet délétère lié à une coupure double brin de l'ADN. Même si il est contrôlé dans le temps et dans l'espace Xer est détourné de son rôle principal par des éléments génétiques mobiles. Ces éléments utilisent XerC et XerD pour catalyser leur intégration et excision du chromosome de leur hôte, pour cela ils sont appelés IMEXs (Integrative Mobile Elements exploiting Xer). L'ensemble des études mécanistiques concernant les IMEXs ont été faites chez *Vibrio cholerae*, et se sont intéressées à des bactériophages filamenteux. Elles ont permis de montrer que chaque classe d'IMEX a un mécanisme propre d'intégration/excision. L'ensemble de ces mécanismes est indépendant de la protéine FtsK. Dans le cas du bactériophage TLC, même si XerD catalyse le premier échange de brins, le domaine γ de FtsK n'est pas requise pour activer la réaction de recombinaison (Midonet et al., 2014).

Je me suis intéressé, pendant une partie de ma thèse, à un IMEX appelé GGI (Gonococcal Genetic Island). Le GGI est un îlot génomique qui s'intègre dépendamment de XerCD au chromosome de *Neisseria gonorrhoeae* (*Ng*). Il est présent dans 80% des souches pathogènes de *Ng*, ce qui souligne sa stabilité sous forme intra-chromosomique. Cet îlot est flanqué d'un côté par le site de résolution des dimères de chromosome de *Ng*: *dif_{Ng}* et de l'autre côté par un site de recombinaison associé au GGI: *dif_{GGI}*. Le site *dif_{GGI}* diffère de *dif_{Ng}* au niveau de 4 pb dans le bras de fixation pour XerD. Il a été postulé que cette divergence en bases entre les deux sites est responsable de la stabilité intra-chromosomique du GGI. Il s'avère que l'ensemble des IMEXs étudiés chez *V.cholerae* semble avoir développé une stratégie pour rester intégré de manière stable dans le chromosome de leur hôte (pour revue: Midonet and Barre, 2014). En me penchant sur le cas du GGI, j'ai voulu comprendre quel était le mécanisme responsable de sa stabilité intra-chromosomique et quel était le réel impact des altérations de *dif_{GGI}* sur la réaction de recombinaison catalysant l'excision du GGI.

Via une étude complète des étapes de recombinaison de l'excision d'un mini-GGI, j'ai pu répondre à ces questions. Cette étude passe par la caractérisation de la formation des complexes par retard de migration électrophorétique (gel retard) et HT-TPM (High Throughput Tethered Particle Motion) (Brunet et al., 2015) (Plénat et al., 2012). Les gels retard permettent de visualiser l'interaction de protéines avec une molécule d'ADN. Cette interaction entraîne un retard de migration observable par électrophorèse qui est corrélé à la formation d'un complexe protéine/ADN. Le TPM est une technique de molécule unique qui permet de suivre la longueur apparente de l'ADN. La molécule d'ADN est rattachée à une lame de verre d'un côté et à une bille de l'autre côté. Par vidéo-microscopie on suit l'amplitude du mouvement Brownien de la bille appelé Aeq. Cet Aeq correspond à la longueur apparente de la molécule d'ADN. Le TPM permet d'observer la formation de la synapse qui correspond au complexe nucléo-protéique contenant deux sites *dif* et un hétérotétramère de recombinaisons. La formation de la synapse entraîne une diminution de la longueur apparente de l'ADN (Diagne et al., 2014). Ces deux techniques m'ont permis de démontrer que les divergences en bases entre les deux sites n'empêchaient pas la formation des complexes XerCD_{Ng}/site de recombinaison ainsi que de la synapse. L'étape suivant la formation de la synapse correspond à l'activation de XerD par le domaine γ de FtsK. J'ai donc construit deux

cassettes de recombinaison qui correspondent à deux sites de recombinaison en répétition directe. Une de ces cassette mime un dimère du chromosome de *Ng* (*dif_{Ng}*-*dif_{Ng}*) et l'autre mime la forme intégrée du GGI (*dif_{Ng}*-*dif_{GGI}*). J'ai testé l'activation de la recombinaison pour ces deux cassettes, en utilisant le domaine γ de FtsK_{Ng} fusionné à XerD_{Ng}. Cette construction rend XerD_{Ng} constitutivement active (Grainge et al., 2011). Pour les deux cassettes construites, la réaction de recombinaison est activable par le sous domaine γ de FtsK de *Ng* *in vitro* et *in vivo* chez *Escherichia coli*. La seule différence observable se trouve au niveau du taux de recombinaison *in vivo* dans une souche d'*Escherichia coli* où le système Xer de *Ng* est reconstruit. Ces différences de taux de recombinaison entre une cassette mimant un dimère de chromosome chez *Ng* et une mimant un GGI intégré sont effacées dans une souche délétée du domaine C-terminal de FtsK_{Ec}. Le moteur de FtsK_{Ec} inhibe donc la recombinaison entre un site *dif_{Ng}* et un site *dif_{GGI}*. Ce phénomène est observable *in vitro*, en utilisant FtsK d'*E.coli* sous forme trimérique, ou *in vivo*, en exprimant en *trans* le domaine C-terminal de FtsK de *Ng*. J'ai pu expliquer ce phénomène d'inhibition en utilisant un test de translocation. En effet, un trimère du moteur de FtsK d'*E.coli* s'arrête sur un complexe XerCD_{Ng}/*dif_{Ng}* mais ne s'arrête pas sur un complexe XerCD_{Ng}/*dif_{GGI}*.

Cette étude a permis de mettre en évidence une nouvelle fonction pour FtsK liée à son activité de translocation. La translocation de FtsK s'arrête spécifiquement sur le site *dif_{Ng}* pour activer la recombinaison, alors qu'elle détruit un complexe formé sur *dif_{GGI}*, ce qui inhibe la réaction de recombinaison. Donc, FtsK a la capacité de faire la différence entre un site de recombinaison dédié à la résolution des dimères de chromosome et un site de recombinaison importé par un élément génétique mobile.

b- Publication

FtsK translocation permits discrimination between an endogenous and an imported Xer/dif recombination complex

Florian Fournes^a, Estelles Crozat^a, Carine Pages^a, Catherine Tardin^b, Laurence Salomé^b, François Cornet^{a,1}, and Philippe Rousseau^{a,1}

^aLaboratoire de Microbiologie et de Génétique Moléculaires (LMGM), Centre de Biologie Intégrative (CBI), Université de Toulouse, CNRS, Université Paul Sabatier, F-31062 Toulouse, France; and ^bInstitut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Université de Toulouse, CNRS, Université Paul Sabatier, F-31062 Toulouse, France

Edited by Nancy E. Kleckner, Harvard University, Cambridge, MA, and approved April 18, 2016 (received for review November 23, 2015)

In bacteria, the FtsK/Xer/dif (chromosome dimer resolution site) system is essential for faithful vertical genetic transmission, ensuring the resolution of chromosome dimers during their segregation to daughter cells. This system is also targeted by mobile genetic elements that integrate into chromosomal dif sites. A central question is thus how Xer/dif recombination is tuned to both act in chromosome segregation and stably maintain mobile elements. To explore this question, we focused on pathogenic *Neisseria* species harboring a genomic island in their dif sites. We show that the FtsK DNA translocase acts differentially at the recombination sites flanking the genomic island. It stops at one Xer/dif complex, activating recombination, but it does not stop on the other site, thus dismantling it. FtsK translocation thus permits cis discrimination between an endogenous and an imported Xer/dif recombination complex.

XerCD | dif | FtsK | GGI | IMEX

In all organisms, the processing of chromosome ends or termini relies on specific activities for replication and segregation. In eukaryotes, telomeres are often targeted by mobile genetic elements, which may even substitute for telomeric functions (1). Circular chromosomes found in prokaryotes have no telomeres but harbor chromosome dimer resolution sites, called dif sites, on which dedicated Xer recombinases (XerC and XerD in most cases) act (2, 3). Besides their role in chromosome maintenance, dif sites are targeted by numerous mobile genetic elements, referred to as integrating mobile element exploiting Xer (IMEX) (4). How IMEXs integrate into dif without inactivating its cellular function and how they are stably maintained in their integrated state has remained unclear despite study over the past decade (4–7). Here we answer these questions by studying the gonococcal genomic island (GGI), an IMEX stably integrated into the dif site of pathogenic *Neisseria* species that encodes crucial functions for gene exchange and virulence (8, 9).

In *Escherichia coli*, chromosome dimers form by homologous recombination during replication and are resolved by site-specific recombination between sister dif sites catalyzed by the XerC and XerD recombinases (Fig. 1) (3). The 28-bp dif site carries binding sites for each recombinase, separated by a 6-bp central region at the border of which strand exchanges are catalyzed. After assembly of the recombination complex (synapse), one pair of strands is exchanged by the XerD monomers, leading to a branched DNA intermediate (Holliday junction, HJ) subsequently resolved by XerC. Dimer resolution is integrated into the general processing of the terminal region of the chromosome (ter region) during cell division (10). FtsK, a DNA translocase associated with the division apparatus, segregates this region at the onset of cell division (10, 11). The translocation motor, FtsK $\alpha\beta$, is located in the C terminal of FtsK (12). Translocation is oriented toward the dif site located at the center of the ter region via a direct interaction between the extreme C-terminal subdomain of FtsK, FtsK γ , and the KOPS DNA motifs (13). Upon reaching the XerCD/dif complex, FtsK stops translocating and activates recombination via direct interaction with XerD (14, 15) (Fig. 1). The mechanisms of translocation arrest and of

recombination activation are poorly understood but they both involve FtsK γ . However, these activities appear to be distinct from each other because FtsK γ can activate recombination in vivo and in vitro when isolated from the FtsK $\alpha\beta$ motor or fused to XerC or XerD (16).

In numerous bacteria, the XerCD/dif system is hijacked by IMEXs, which integrate their host genome into dif sites by using XerCD-mediated catalysis (4). In all of the reported cases, integration of IMEXs recreates a bona fide dif site, thereby not interfering with chromosome dimer resolution, which would lead to their counter-selection. The best-described examples are *Vibrio cholerae* IMEXs, which carry crucial virulence determinants (5–7, 17). These IMEXs have developed different strategies to integrate and to remain stably integrated, although the mechanisms ensuring their stable maintenance are not fully understood. *Neisseria* species contain an unusually long IMEX called the gonococcal genomic island (GGI) (8). In *Neisseria gonorrhoeae*, the GGI is 57 kb long and encodes a type IV secretion system that exports the chromosomal DNA of its host, rendering it available to neighboring cells for gene exchange by genetic transformation (8, 18). The GGI carries a dif site, dif_{GGI}, consisting of a XerC-binding site, a central region homologous to the *Neisseria* dif site, dif_{Ng}, and a divergent XerD-binding site (Fig. 1B). Comparison of *N. gonorrhoeae* strains harboring or lacking the GGI, together with functional data, indicates that the GGI integrates by XerCD-dependent recombination (9). The nonreplicative excised circular form of the GGI can be detected and the GGI can also be lost, showing that excision occurs, although at low frequencies (9). Although the GGI

Significance

This study focuses on a molecular machine (Xer/dif/FtsK) involved in circular chromosome processing during the bacterial cell cycle. Xer site-specific recombinases are well known to act at the chromosomal dif (dimer resolution) sites for chromosome dimer resolution (CDR). The Xer/dif recombination machine is, however, highly versatile and is also implicated in integration and excision of mobile genetic elements (MGE). Whereas CDR depends on the FtsK DNA translocase, MGE mobility somehow escapes this control. Focusing on the case of the gonococcal genetic island found in pathogenic *Neisseria* species, we reveal how FtsK distinguishes a Xer/dif complex involved in vertical genetic transfer (CDR) from one involved in horizontal gene transfer (MGE mobility).

Author contributions: F.F., E.C., F.C., and P.R. designed research; F.F., C.P., and P.R. performed research; F.F., E.C., C.T., and P.R. contributed new reagents/analytic tools; F.F., E.C., C.T., L.S., F.C., and P.R. analyzed data; and F.F., F.C., and P.R. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

Freely available online through the PNAS open access option.

¹To whom correspondence may be addressed. Email: philippe.rousseau@ibcg.biotoul.fr or francois.cornet@ibcg.biotoul.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1523178113/-DCSupplemental.

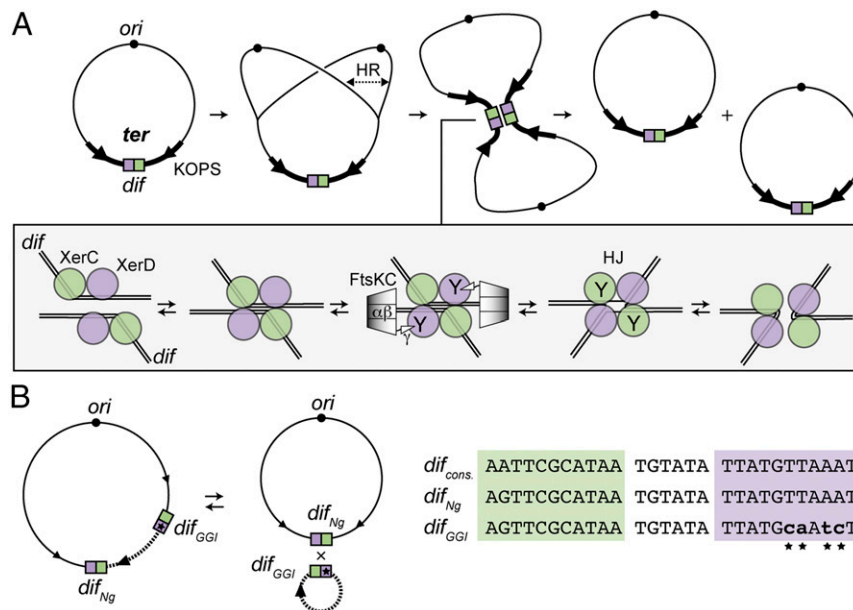


Fig. 1. The XerCD/*dif* recombination. (A) Chromosome dimer formation by homologous recombination (HR) during replication and resolution by site-specific recombination between the two *dif* sites. The *dif* site is represented as green and purple boxes for the XerC-binding and the XerD-binding sites, respectively. ori (black circle), some KOPS motifs (arrows), and the *ter* domain (thick line) are represented. The mechanism of XerCD/*dif* recombination is represented in the box. XerC (green circles) and XerD (purple circles) bind two distant *dif* sites to create a synapse. Hexamers of the FtsK C-terminal domain [FtsKC: FtsK α : (diamonds) + FtsK γ : (triangle) contacting XerD] translocate toward *dif* and contact XerD. This activates XerD (Y indicates the active recombinases), which catalyzes the first-strand exchange. This process leads to the formation of an HJ intermediate within which XerC is active and catalyzes the second-strand exchange (3). (B) Integration and excision of the GGI (dotted line) by XerCD catalysis. KOPS, *dif_{Ng}*, and *dif_{GGI}* sites are represented as in A. An alignment of *dif_{Ng}*, *dif_{GGI}* and consensus *dif* sequence (27, 28) is shown on the left. Substituted positions in *dif_{GGI}* are represented as lowercase characters and highlighted by stars.

was identified over a decade ago, it has remained unclear how DNA flanked by two Xer recombination sites is stably maintained at a chromosomal locus processed by FtsK during each cell cycle. In this study, we have combined in vitro and in vivo approaches to show that *dif_{GGI}* is indeed an active Xer recombination site at which the *Neisseria* Xer recombinases catalyze recombination when activated by FtsKy. However, we find that recombination between *dif_{Ng}* and *dif_{GGI}* is inhibited by translocating FtsK. Inhibition is a result of the absence of translocation arrest at XerCD_{Ng}/*dif_{GGI}* complexes that most likely precludes recombination activation, an absence that causes the complex to dismantle. We conclude that, depending on the sequence of the recombination site, Xer recombination complexes have the intrinsic capacity to be activated or inhibited by FtsK.

Results

Xer Recombination Complexes Readily Form at *dif_{Ng}* and *dif_{GGI}*

N. gonorrhoeae encodes XerC and XerD homologs as well as two FtsK homologs (19). We cloned and purified tagged versions of XerC_{Ng} and XerD_{Ng} (Methods, SI Text, and Fig. S14) and used the two proteins in EMSA experiments. XerC_{Ng} or XerD_{Ng} alone formed two complexes with either radiolabeled *dif_{Ng}* or *dif_{GGI}* (Fig. 2, SI Text, and Fig. S1 B and C). Comparison with results from the *E. coli* Xer system suggests that the first complex corresponds to the binding of one recombinase monomer (*dif*-Xer), and the second to the binding of two recombinases monomers to both sides of the recombination sites (*dif*-Xer²) (20). The ratios of these two complexes were different between the *dif_{Ng}* and *dif_{GGI}* sites (SI Text and Fig. S1 B and C). However, the overall efficiency of either XerC_{Ng} or XerD_{Ng} binding was similar on the two sites. As in the case in *E. coli*, XerC_{Ng} and XerD_{Ng} bound cooperatively to *dif_{Ng}* (Fig. 2B and Fig. S1E). Similar efficiencies of complex formation were obtained with *dif_{GGI}* (Fig. 2D and Fig. S1E). We concluded that XerD_{Ng} readily binds to *dif_{GGI}* despite the four base changes of its predicted binding site compared with *dif_{Ng}* (Fig. 1). In addition, XerCD_{Ng}/*dif_{GGI}* complexes formed as efficiently as XerCD_{Ng}/*dif_{Ng}* complexes by cooperative binding of the two recombinases.

Once assembled, XerCD-*dif* complexes come together in a recombination-proficient complex containing two monomers of each recombinase gathering two recombination sites (Fig. 1A). We used tethered particle motion (TPM) (21, 22), a single-molecule technique that involves tracking beads attached at one end of the DNA molecules while the other extremity of the DNA is tethered to a coverslip (Methods and Fig. 3A). The amplitude of motion at equilibrium of the bead (Aeq) directly depends on the apparent length of the DNA (22, 23). We constructed two 2,311-bp long

DNA molecules, containing either two *dif_{Ng}* sites or a *dif_{Ng}* and a *dif_{GGI}* site separated by 945 bp, and recorded their Aeq with a recently developed multiplexed version of the TPM [high-throughput (HT)-TPM] (Methods and Fig. 3A) (22). Addition of XerC_{Ng} and XerD_{Ng} to either DNA molecule resulted in a displacement toward smaller values and a broadening of Aeq distribution well fitted by two Gaussian peaks (Fig. 3B, Right). The first peak (I: 70% of the probability density) was shortened by 10 nm compared with the naked DNA. This shortening was too small to be a result of formation of a recombination complex and was more likely because of XerD_{Ng} binding to the recombination sites, as

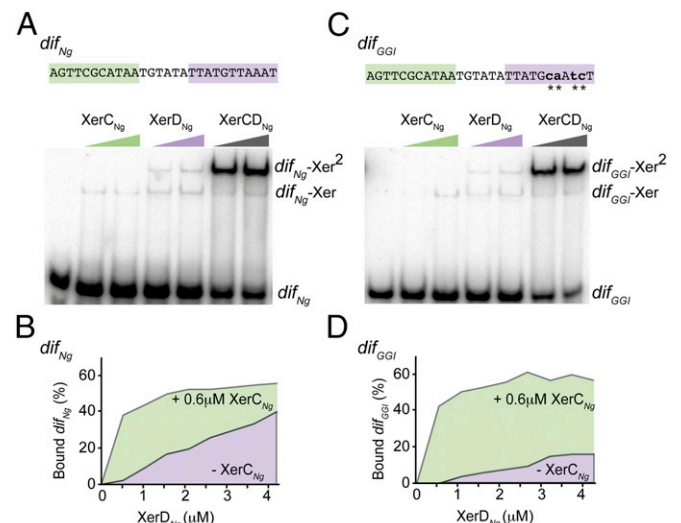


Fig. 2. XerC_{Ng} and XerD_{Ng} bind to *dif_{Ng}* and *dif_{GGI}*. EMSA experiment showing the interaction between an increasing concentration of XerC_{Ng} (0.4 and 0.6 μM) and XerD_{Ng} (1.4 and 1.8 μM) and a 28-bp DNA fragment containing either *dif_{Ng}* (A) or *dif_{GGI}* (C). The color code used is the same as in Fig. 1. Unbound DNA (*dif*), complexes with one recombinase bound (*dif*-Xer), and complexes with two recombinases bound (*dif*-Xer²) are represented. In C, substituted positions in *dif_{GGI}* are represented as lowercase characters and highlighted by stars. (B and D) Titration experiment of *dif_{Ng}* (B) or *dif_{GGI}* (D) by XerD_{Ng}. The experiment was done in presence (underlined with green) or in absence (underlined with purple) of XerC_{Ng} (see also Fig. S1E).

previously observed with *E. coli* XerD (21). The second peak (II: 30% of the probability density) was shortened by 60 nm. Considering the TPM calibration equation [ΔAeq (in nm) = $0.0623 L$ (in bp) + 92.3; measured in these very same experimental conditions (21)], this shortening was consistent with the formation of a recombination complex ($Aeq = 0.0623 \times 945 \sim 59$ nm). No difference was detected between the DNA containing either two dif_{Ng} or one dif_{Ng} and one dif_{GGI} (Fig. 3B and C). We concluded that XerC_{Ng} and XerD_{Ng} form recombination complexes between dif_{Ng} sites. Most importantly, equivalent complexes also formed between dif_{Ng} and dif_{GGI} , suggesting that the base changes present in dif_{GGI} do not affect the formation of recombination complexes.

Both dif_{Ng} and dif_{GGI} Are Active Xer Recombination Sites. To directly monitor recombination, we constructed two reporter-cassettes, dif_{Ng} - dif_{Ng} and dif_{Ng} - dif_{GGI} , containing a kanamycin-resistance gene between the two dif sites, and inserted them on a plasmid (Fig. 4A). In vitro assays performed by incubating the dif_{Ng} - dif_{Ng} plasmid with XerC_{Ng} and XerD_{Ng} resulted in the appearance of a faint quantity of branched DNA containing a HJ [Fig. 4B, Left (Center column); see SI Text and Fig. S2 for HJ characterization], an intermediate in Xer recombination (16). These HJ-containing forms were not detected with the dif_{Ng} - dif_{GGI} plasmid [Fig. 4C, Left (Center column)]. We next constructed a constitutively active version of XerD_{Ng}, XerD_{Ng}^{*}, by fusing the FtsK_Y subdomain of *N. gonorrhoeae* to the C terminus of XerD_{Ng} (Methods and Figs. S1A and D and S2) (16). Substituting XerD_{Ng} for XerD_{Ng}^{*} yielded increased levels of HJ and recombination products for both dif_{Ng} - dif_{Ng} - and dif_{Ng} - dif_{GGI} -containing plasmids [Fig. 4B and C, Left (Right columns)]. In these reactions, XerD_{Ng}^{*} likely catalyzes the initial strand exchange because the HJ were not detected using a catalytically inactive variant of this protein (SI Text and Fig. S2). We conclude that FtsK_Y_{Ng} activates Xer recombination by activating XerD_{Ng}-mediated catalysis and that FtsK_Y_{Ng} can activate recombination between dif_{Ng} and dif_{GGI} to the same level as recombination between dif_{Ng} sites.

To assess the activity of XerCD_{Ng} in vivo, we then placed these reporter cassettes into the *E. coli* chromosome in place of the natural dif site (Methods and Fig. 4A). In the strains carrying the cassettes on their chromosome, the endogenous $xerC$ gene was replaced by $xerC_{Ng}$, whereas the endogenous $xerD$ was deleted (Methods). Recombination was induced by transformation with a plasmid containing $xerD_{Ng}$ under the control of an arabinose-inducible promoter (Methods). In *E. coli*, XerC_{Ng} and XerD_{Ng} promoted recombination between dif_{Ng} sites, which partly depended on *E. coli* FtsK (FtsK_{Ec}) (Fig. 4B, Right). Recombination was increased and became independent of FtsK_{Ec} when XerD_{Ng} was replaced with XerD_{Ng}^{*} (Fig. 4B, Right). Recombination between dif_{Ng} and dif_{GGI} differed from dif_{Ng} - dif_{Ng} recombination in several ways. Recombination was barely detected between dif_{Ng} and dif_{GGI} with XerC_{Ng} and XerD_{Ng} (Fig. 4C, Right), consistent with the absence of the HJ in vitro (Fig. 4C, Left). Recombination between dif_{Ng} and dif_{GGI} is thus less efficient than recombination between two dif_{Ng} . Substituting XerD_{Ng} by XerD_{Ng}^{*} increased recombination, showing that, as observed in vitro (Fig. 4C, Right), the *Neisseria* FtsK_Y_{Ng} domain activates recombination between dif_{Ng} and dif_{GGI} . This finding confirms that dif_{GGI} is an active site that recombines with dif_{Ng} when activated by FtsK_Y_{Ng}.

The FtsKC Motor Inhibits GGI Excision. Surprisingly, XerC_{Ng}-XerD_{Ng}^{*} catalyzed recombination between dif_{Ng} and dif_{GGI} strongly increased in a strain deleted for the whole C-terminal part of FtsK_{Ec} (FtsK_{Ec}^{ΔC}) (Fig. 4C, Right) and reached frequencies equivalent to those of the dif_{Ng} - dif_{Ng} recombination in the same strain (compare Fig. 4B and C, Right). Thus, the whole *E. coli* FtsK C-terminal domain (FtsK_{Ec}^C) inhibits dif_{Ng} - dif_{GGI} recombination in these conditions. This observation prompted us to explore the effect of the C-terminal part of *Neisseria* FtsK (FtsK_{Ng}^C) on XerC_{Ng}-XerD_{Ng}^{*}-driven recombination between dif_{Ng} and dif_{GGI} . Production of FtsK_{Ng}^C from a plasmid in an otherwise ΔC strain (SI Text and Fig. S3) yielded 27% inhibition of XerC_{Ng} and XerD_{Ng}^{*} catalyzed recombination between dif_{Ng} and dif_{GGI} (Fig. S3). FtsK_{Ng}^C thus

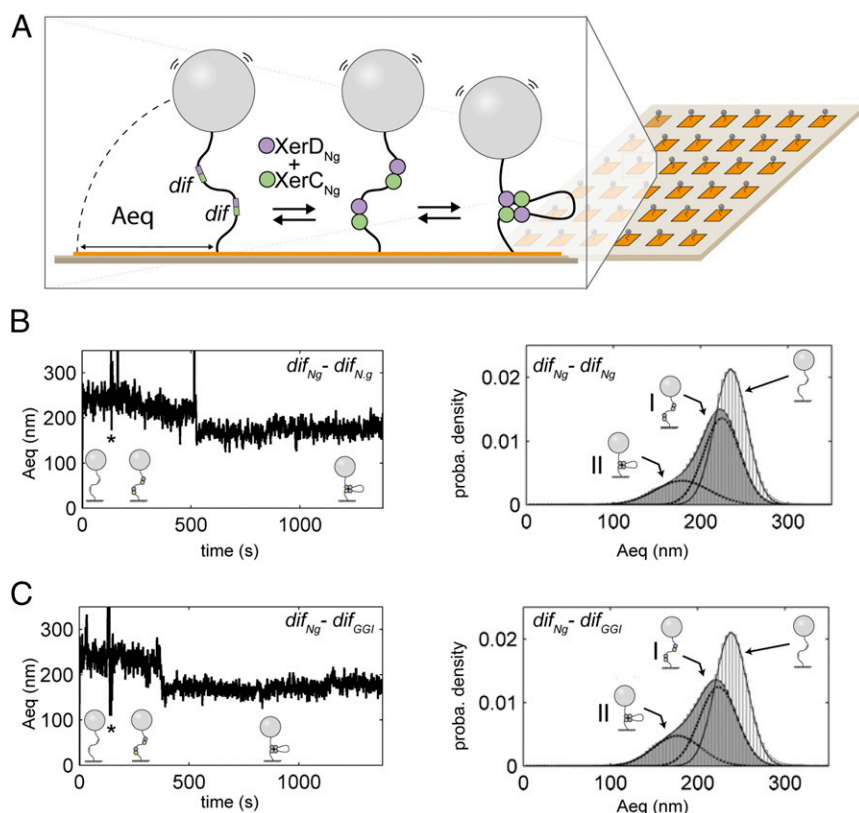


Fig. 3. HT-TPM measurement of recombination complex formation. (A) A glass coverslip (pale brown) is coated with neutravidin (orange). A DNA molecule is attached to this surface by biotin bound to one of its 5' end. A latex bead coated with anti-digoxigenin is bound to the other extremity of the DNA carrying digoxigenin at its 5' end. XerC_{Ng} and XerD_{Ng} (green and purple circles) bind dif sites (green and purple boxes) and the formation of a complex between two dif sites significantly decreases the amplitude of bead motion (Aeq). (B and C, Left) Typical traces [$Aeq = f(\text{time})$] observed for DNA molecules containing either two dif_{Ng} sites (B) or one dif_{Ng} one dif_{GGI} sites (C). Stars (*) indicate the times of XerCD_{Ng} mix injection. Schemes of the inferred DNA structures of the DNA are shown underneath each trace. (Right) Probability distributions of Aeq before protein addition (light gray) and during the 20 min following XerCD_{Ng} addition (dark gray). The Gaussian fitting curves, used to characterize the different DNA subpopulations contributing to the Aeq distributions, are superimposed to the distributions as well as the schemes of the inferred DNA structures for each subpopulation (I refers to the first peak and II to the second).

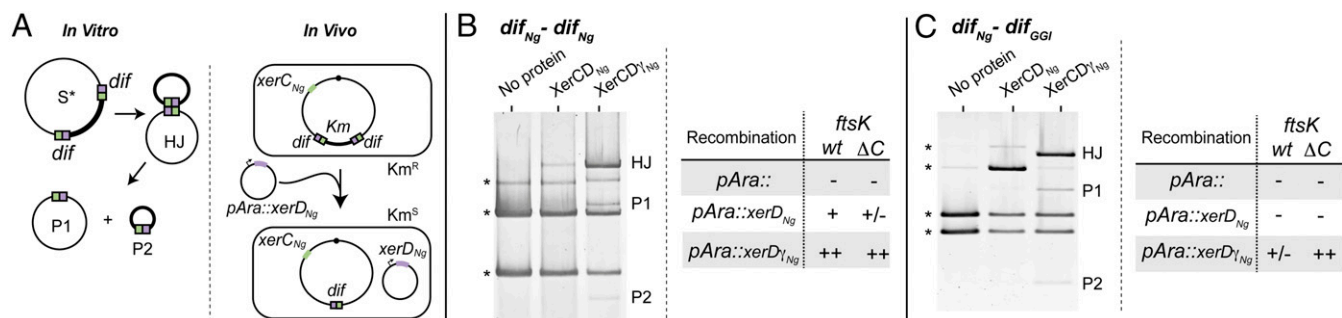


Fig. 4. In vivo and In vitro GGI excision. (A) Schemes of the in vitro (Left) and in vivo (Right) assays used. The color code is as in Fig. 1. (B) In vitro recombination reactions using plasmids containing the *dif_{Ng}*-*dif_{Ng}* cassette. After DNA restriction, substrate (*) and products (HJ, P1, and P2) are separated by electrophoresis. In vivo recombination reactions using *E. coli* strains containing the *dif_{Ng}*-*dif_{Ng}* cassette inserted at the *dif* locus. Recombination was scored as the appearance of kanamycin-sensitive colonies after production of either XerD_{Ng} or XerD_{Ng}. The experiment was done in wt and ΔC *ftsK* strains (Methods). -, Less than 2%; ±, 2–10%; +, 10–50%; ++, 50–100% kanamycin colonies (see also Table S1). (C) Same as B but for *dif_{Ng}*-*dif_{GGI}* cassettes.

inhibited recombination between *dif_{Ng}* and *dif_{GGI}*, although to a lower extent compare with FtsK_{EC}. This difference might be because of a poor activity of FtsK_{EC} in these conditions. Importantly, recombination between two *dif_{Ng}* sites was neither inhibited by FtsK_{EC} nor by FtsK_{EC}. This result shows that FtsK specifically inhibits recombination between the *dif_{Ng}* and *dif_{GGI}* sites.

To assay the role of the FtsK motor in vitro, we used purified trimeric FtsKαβγ_{EC} (t-FtsKαβγ_{EC}) constructed from *E. coli* FtsK, which is known to translocate efficiently (24). We also used linear instead of supercoiled DNA substrates to lower the efficiency of recombination and ease the detection of inhibitory effects (Methods and Fig. S4A). In these conditions, both *dif_{Ng}*-*dif_{Ng}* and the *dif_{Ng}*-*dif_{GGI}* reporter cassettes formed HJ intermediates in equivalent amounts in the presence of XerC_{Ng} and XerD_{Ng} but no complete duplex products were detected (Fig. 5B). Addition of t-FtsKαβγ_{EC} and ATP to reactions containing XerC_{Ng} and XerD_{Ng} did not alter HJ formation between *dif_{Ng}* sites (Fig. 5B, Left). Conversely, addition of t-FtsKαβγ_{EC} lowered HJ quantity detected between *dif_{Ng}* and *dif_{GGI}* (Fig. 5B, Right). This effect was ATP-dependent (Fig. 5B and Fig. S4A), suggesting it was caused by the translocation activity of t-FtsKαβγ_{EC}. Although we cannot completely exclude that t-FtsKαβγ_{EC} stimulates HJ resolution back to its initial substrate form, we inferred that t-FtsKαβγ_{EC} inhibits HJ formation. Taken together, these results strongly suggest that recombination between *dif_{Ng}* and *dif_{GGI}* is inhibited by the translocase activity of t-FtsKαβγ_{EC}.

FtsK Translocation Stops on XerCD_{Ng}/*dif_{Ng}* but Not on XerCD_{Ng}/*dif_{GGI}*

FtsK is a powerful translocase able to displace proteins bound to DNA in vitro (14, 15). In contrast, FtsK specifically stops on XerCD/*dif* complexes, which is likely a prerequisite for the activation of recombination (14–16, 25). Because FtsK appears to inhibit the first steps of recombination between *dif_{Ng}* and *dif_{GGI}*, we tested

its capacity to stop translocating when encountering XerCD_{Ng}/*dif_{GGI}* complexes. We took advantage of the fact that t-FtsKαβγ_{EC} translocation was shown to break a biotin–streptavidin link placed at the end of a DNA molecule (24). One extremity of a DNA molecule containing a recombination site (*dif_{Ng}* or *dif_{GGI}*) was attached to a magnetic bead by a biotin/streptavidin link. t-FtsKαβγ_{EC} should only break the biotin/streptavidin link and dissociate the DNA from the bead if a XerCD/*dif* complex was unable to stop translocation (Fig. 6A). The quantity of free DNA yielded after t-FtsKαβγ_{EC} action is thus inversely proportional to the capacity of a XerCD/*dif* complex to stop translocation. Results are shown in Fig. 6B, with the total DNA (after heat denaturation) presented beside the free DNA recovered in the supernatant after magnetic pull-down. Incubation of the DNA-bead complexes with t-FtsKαβγ_{EC} (and ATP) led to an increase in the quantity of free DNA recovered compared with incubation with XerCD_{Ng}. Dissociation of the DNA-bead complexes depended on the concentration of t-FtsKαβγ_{EC} and ATP, suggesting that it is a result of translocation of t-FtsKαβγ_{EC} (SI Text and Fig. S4B). Addition of XerC_{Ng} and XerD_{Ng} in absence of t-FtsKαβγ_{EC} did not dissociate the DNA-bead complexes (Fig. 6B). When XerC_{Ng}, XerD_{Ng}, and t-FtsKαβγ_{EC} were incubated together with the *dif_{Ng}*-containing DNA-bead complexes, the quantity of free DNA decreased, showing that t-FtsKαβγ_{EC} translocation stops at XerCD_{Ng}/*dif_{Ng}* complexes (Fig. 6B). The difference of free DNA recovered in the absence and in the presence of the recombinases (percent protection) (Fig. 6B) showed significant although not total arrest of FtsK. This result is consistent with the binding experiment (Fig. 2), which did not show 100% *dif_{Ng}* binding by XerCD_{Ng}, and with previous FtsK arrest experiments (14). This protection effect was independent of the orientation of the *dif_{Ng}* site (i.e., FtsK reaching the XerCD_{Ng}/*dif_{Ng}* complex by its XerC_{Ng} or XerD_{Ng} side) (Fig. S4C). In contrast to this finding, incubation of XerC_{Ng}, XerD_{Ng}, and t-FtsKαβγ_{EC} with *dif_{GGI}*-containing DNA-bead

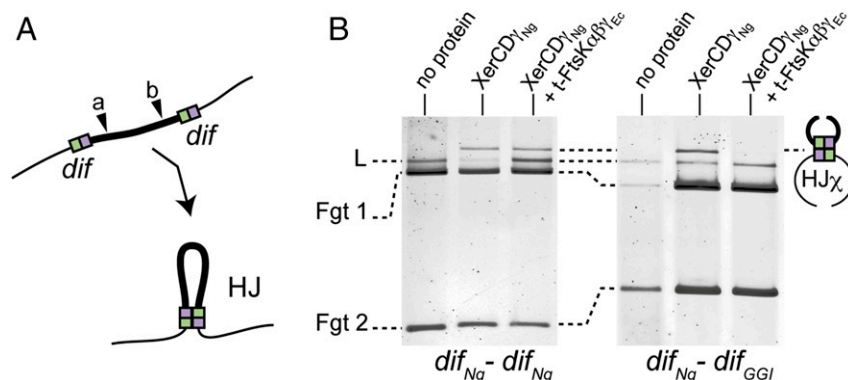


Fig. 5. In vitro HJ formation. (A) Schematic of the in vitro HJ formation assay using a color code as in Fig. 1. NcoI restriction site is represented: (a) for *dif_{Ng}*-*dif_{Ng}* cassette and (b) for *dif_{Ng}*-*dif_{GGI}* cassette. (B) HJ formation for *dif_{Ng}*-*dif_{Ng}* (Left) or *dif_{Ng}*-*dif_{GGI}* (Right) cassettes. As indicated, DNA substrates were incubated with XerD_{Ng} and XerD_{Ng} ± t-FtsKαβγ_{EC}. After DNA restriction, HJ_X were separated from substrate DNA by electrophoresis: linear (L, partial restriction) and fragments (Fgt 1 and Fgt 2, total restriction).

Methods

Strain and Plasmids. *N. gonorrhoeae* *xerC_{Ng}* and *xerD_{Ng}* genes (NGO0035 and NGO0329), were synthesized by Genscript and cloned in pET32b (Navagen) to give pROUT008 and pROUT011 plasmids. pROUT008 was used to construct *xerD_{YNg}* (pFF011). *N. gonorrhoeae* *xerC_{Ng}* and *xerD_{Ng}* genes were also cloned into pBAD18 to give the pCP127 and pCP128, respectively, and pCP128 was used to introduce *xerD_{YNg}* into pBAD18 (pFF013). For in vitro analysis, synthetic Kanamycin-resistant cassettes (pFF01: *dif_{Ng}*-Kn-*dif_{Ng}*, pFF03: *dif_{Ng}*-Kn-*dif_{GGI}*) were generated on pUC57 and transferred into *E. coli* (DS941: AB1157*recF143 lacIq Δ(lacZ)M15*). In *E. coli* CP1088 [LN2666: W1485 *F-leu thyA thi deoB* or *C supE rpsL* (StR); *xerD::ftrt*; *xerC::ftrt*], the *dif* site was substituted by one of the two possible cassettes, using a previously described insertion/deletion procedure (31) (CP1106, CP1108). To produce *XerC_{Ng}* in these strains, *xerC_{Ng}* was inserted at the *xerC::ftrt* locus (31): CP1182 (CP1106, *xerC_{Ng}*); CP1184 (CP1108, *xerC_{Ng}*). To produce *XerD_{Ng}* or *XerD_{YNg}*, these strains were transformed by pBAD18 derivatives carrying *xerD_{Ng}* or *xerD_{YNg}*.

Protein Purification. Expression plasmids (pROUT008 or pROUT011 or pFF011) were used to transform the *E. coli* BL2-DE3 strain. Xer proteins were purified as described previously (21). The purification of t-FtsKαβγ_{EC} was performed as in ref. 24.

EMSA. The 28-bp 5'-end-labeled [³²P] DNA fragments carrying *dif_{Ng}* and *dif_{GGI}* sites were used in a binding reaction carried out as in ref. 32 and analyzed with a typhoon TRIO GE.

Multiplexed Tethered Particle Motion Analysis. The overall HT-TPM procedure, including data analysis, has been described previously (22, 33). The 2,311-bp long DNA molecules were produced by PCR from pFF01, pFF03, and purified as previously described (21). Data acquisitions were performed at 22 °C for 25 min. The initial step of 2 min corresponds to the tracking of the DNA-beads complexes in the reaction buffer (10 mM Tris-HCl pH 8, 160 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, and 1 mg/mL Pluronic F-127). It is followed by the injection of a mix of 50 nM *XerD_{Ng}* and 50 nM *XerC_{Ng}* diluted in the same buffer.

Recombination Assays. In vivo recombination experiments were performed using CP1182, or CP1184 strains transformed with pCP128 or pFF03, as previously described (32). In vitro recombination reactions were performed as previously described (16). The final concentration of each Xer protein was 0.8 μM. The concentration of substrate plasmid used was 300 ng per reaction. After 1 h at 30 °C, phenol/chloroform extraction and ethanol precipitation, products were digested by NcoI and ScaI (Fermentas), analyzed on 0.8% agarose gels, and visualized by Sybr Green coloration using Typhoon-Trio-GE. For HJ detection, 50 ng of linear DNA [NdeI (Fermentas) digestion of pFF01 or pFF03] was incubated with proteins (160 nM *XerC_{Ng}* + 160 nM *XerD_{YNg}* ± 1 μM t-FtsKαβγ_{EC}) in a buffer containing 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 0.5% glycerol, 0.02 mM EDTA, 0.02 mM DTT, 0.1% PEG 8000, 75 mM NaCl, and 6.25 mM ATP. After incubation at room temperature for 20 min, DNA was purified as described for the in vitro recombination assay (see above), digested by NcoI (Fermentas), and finally analyzed as described for the in vitro recombination assay (see above).

Translocation Test. DNA molecules were obtained by PCR on pFF01 or pFF02. These DNA molecules were mixed with streptavidin-coated magnetic beads (Streptavidin MagneSphere, Promega), at a ratio of 15 ng of DNA for 1 mL of the commercial beads solution, in 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂ buffer. After 30-min incubation at room temperature, beads were precipitated and washed to eliminate most unbound DNA. Translocation reactions were carried out in 25 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 10% (vol/vol) glycerol, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 250 mM NaCl, 5 mM ATP. Reactions contained 45 ng of DNA and 500 nM of each protein present: t-FtsKαβγ_{EC} and/or *XerD_{Ng}* and *XerC_{Ng}*. Reactions were incubated at room temperature for 1 min and beads were precipitated. Supernatant was collected and placed at 42 °C for 15 min with buffer containing 10% SDS, 2 mg/mL proteinase K, 0.01 mg/mL biotin. Products were analyzed by electrophoresis, as described above.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank all the members of our teams, F.-X. Barre, and C. Midonet for helpful discussions; M. Sahli and B. Laisnez for technical assistance; A. Segall for providing peptides; and C. Johnston for help with the manuscript. This work was funded by the CNRS, University of Toulouse 3–Paul Sabatier and ANR Contracts 11NANO01003 and 14CE10000701; and a fellowship from the “Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche” (to F.F.).

- Levin HL, Moran JV (2011) Dynamic interactions between transposable elements and their hosts. *Nat Rev Genet* 12(9):615–627.
- Blakely G, et al. (1993) Two related recombinases are required for site-specific recombination at *dif* and *cer* in *E. coli* K12. *Cell* 75(2):351–361.
- Crozat E, Fournes F, Cornet F, Hallet B, Rousseau P (2014) Resolution of multimeric forms of circular plasmids and chromosomes. *Microbiol Spectr* 2(5).
- Das B, Martinez E, Midonet C, Barre F-X (2013) Integrative mobile elements exploiting Xer recombination. *Trends Microbiol* 21(1):23–30.
- Bischerour J, Spangenberg C, Barre F-X (2012) Holliday junction affinity of the base excision repair factor Endo III contributes to cholera toxin phage integration. *EMBO J* 31(18):3757–3767.
- Midonet C, Das B, Paly E, Barre F-X (2014) XerD-mediated FtsK-independent integration of TLCφ into the *Vibrio cholerae* genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 111(47):16848–16853.
- Val M-E, et al. (2005) The single-stranded genome of phage CTX is the form used for integration into the genome of *Vibrio cholerae*. *Mol Cell* 19(4):559–566.
- Dillard JP, Seifert HS (2001) A variable genetic island specific for *Neisseria gonorrhoeae* is involved in providing DNA for natural transformation and is found more often in disseminated infection isolates. *Mol Microbiol* 41(1):263–277.
- Dominguez NM, Hackett KT, Dillard JP (2011) XerCD-mediated site-specific recombination leads to loss of the 57-kilobase gonococcal genetic island. *J Bacteriol* 193(2):377–388.
- Stouf M, Meile J-C, Cornet F (2013) FtsK actively segregates sister chromosomes in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 110(27):11157–11162.
- Crozat E, Rousseau P, Fournes F, Cornet F (2014) The FtsK family of DNA translocases finds the ends of circles. *J Mol Microbiol Biotechnol* 24(5-6):396–408.
- Löwe J, et al. (2008) Molecular mechanism of sequence-directed DNA loading and translocation by FtsK. *Mol Cell* 31(4):498–509.
- Bigot S, et al. (2005) KOPS: DNA motifs that control *E. coli* chromosome segregation by orienting the FtsK translocase. *EMBO J* 24(21):3770–3780.
- Graham JE, Sivanathan V, Sherratt DJ, Arciszewska LK (2010) FtsK translocation on DNA stops at XerCD-*dif*. *Nucleic Acids Res* 38(1):72–81.
- Lee JY, Finkelstein IJ, Arciszewska LK, Sherratt DJ, Greene EC (2014) Single-molecule imaging of FtsK translocation reveals mechanistic features of protein-protein collisions on DNA. *Mol Cell* 54(5):832–843.
- Grainge I, Lesterlin C, Sherratt DJ (2011) Activation of XerCD-*dif* recombination by the FtsK DNA translocase. *Nucleic Acids Res* 39(12):5140–5148.
- Das B, Bischerour J, Barre F-X (2011) VJphi integration and excision mechanisms contribute to the genetic diversity of *Vibrio cholerae* epidemic strains. *Proc Natl Acad Sci USA* 108(6):2516–2521.
- Hamilton HL, Dominguez NM, Schwartz KJ, Hackett KT, Dillard JP (2005) *Neisseria gonorrhoeae* secretes chromosomal DNA via a novel type IV secretion system. *Mol Microbiol* 55(6):1704–1721.
- Chen C-C, et al. (2011) Draft genome sequence of a dominant, multidrug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* strain, TCDC-NG08107, from a sexual group at high risk of acquiring human immunodeficiency virus infection and syphilis. *J Bacteriol* 193(7):1788–1789.
- Blakely GW, Davidson AO, Sherratt DJ (1997) Binding and cleavage of nicked substrates by site-specific recombinases XerC and XerD. *J Mol Biol* 265(1):30–39.
- Diagne CT, et al. (2014) TPM analyses reveal that FtsK contributes both to the assembly and the activation of the XerCD-*dif* recombination synapse. *Nucleic Acids Res* 42(3):1721–1732.
- Plénat T, Tardin C, Rousseau P, Salomé L (2012) High-throughput single-molecule analysis of DNA-protein interactions by tethered particle motion. *Nucleic Acids Res* 40(12):e89.
- Manghi M, et al. (2010) Probing DNA conformational changes with high temporal resolution by tethered particle motion. *Phys Biol* 7(4):046003.
- Crozat E, et al. (2010) Separating speed and ability to displace roadblocks during DNA translocation by FtsK. *EMBO J* 29(8):1423–1433.
- Yates J, Zawadzki P, Sherratt DJ, Kapanidis AN, Arciszewska LK (2015) Assembly, translocation, and activation of XerCD-*dif* recombination by FtsK translocase analyzed in real-time by FRET and two-color tethered fluorophore motion. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(37):E5133–E5141.
- Yates J, Aroyo M, Sherratt DJ, Barre F-X (2003) Species specificity in the activation of Xer recombination at *dif* by FtsK. *Mol Microbiol* 49(1):241–249.
- Kono N, Arakawa K, Tomita M (2011) Comprehensive prediction of chromosome dimer resolution sites in bacterial genomes. *BMC Genomics* 12(1):19.
- Carnoy C, Roten C-A (2009) The *dif*/Xer recombination systems in proteobacteria. *PLoS One* 4(9):e6531.
- Graham JE, Sherratt DJ, Szczelkun MD (2010) Sequence-specific assembly of FtsK hexamers establishes directional translocation on DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(47):20263–20268.
- Bigot S, Corre J, Louarn J-M, Cornet F, Barre F-X (2004) FtsK activities in Xer recombination, DNA mobilization and cell division involve overlapping and separate domains of the protein. *Mol Microbiol* 54(4):876–886.
- Cornet F, Louarn J, Patte J, Louarn JM (1996) Restriction of the activity of the recombination site *dif* to a small zone of the *Escherichia coli* chromosome. *Genes Dev* 10(9):1152–1161.
- Nolivos S, Pages C, Rousseau P, Cornet F (2010) Are two better than one? Analysis of an FtsK/Xer recombination system that uses a single recombinase. *Nucleic Acids Res* 38(19):6477–6489.
- Brunet A, et al. (2015) Probing a label-free local bend in DNA by single molecule tethered particle motion. *Nucleic Acids Res* 43(11):e72.
- Vanhooft V, Normand C, Galloy C, Segall AM, Hallet B (2010) Control of directionality in the DNA strand-exchange reaction catalysed by the tyrosine recombinase TnpI. *Nucleic Acids Res* 38(6):2044–2056.

Supporting Information

Fournes et al. 10.1073/pnas.1523178113

SI Text

Binding of XerC_{Ng}, XerD_{Ng} and XerD_{γNg} to *dif*_{Ng} and *dif*_{GGI}. NGO0035 (*xerC*_{Ng}) and NGO0329 (*xerD*_{Ng}) from *Neisseria gonorrhoeae* (NC-002946) were cloned and purified as tagged version (*Methods* and Fig. S1A). These proteins were used in EMSA experiments (*Methods*, Fig. 2, and Fig. S1B and C) to detect Xer/*dif* complexes (20). In the concentration range we used, XerC_{Ng} formed two complexes with *dif*_{Ng} but only one with *dif*_{GGI}. In the same experiment, XerD_{Ng} alone formed two complexes with either *dif*_{Ng} or *dif*_{GGI}. Results suggest that XerC_{Ng} binds DNA more efficiently than XerD_{Ng} and that XerD_{Ng} forms directly *dif*_{Ng}-Xer² complexes but not *dif*_{GGI}-Xer² ones. However, the overall efficiency of binding of XerC_{Ng} or XerD_{Ng} to *dif*_{Ng} and *dif*_{GGI} was not significantly different.

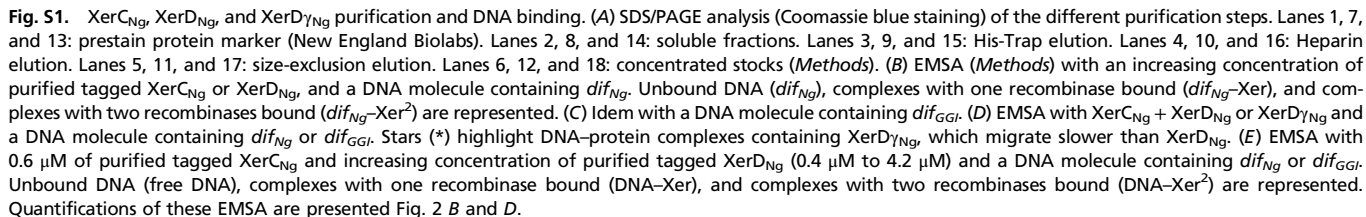
To test XerD_{Ng} activation by FtsK_{Ng}, we constructed a fusion between XerD_{Ng} and the γ domain of *N. gonorrhoeae* FtsK, as previously done with *Escherichia coli* proteins (16). Alignment of FtsK homologs pointed the protein of the NGO0590 gene as the FtsK homolog most likely involved in activating Xer recombination in *N. gonorrhoeae* (19). We therefore used the part corresponding to the *ftsK*_γ subdomain (192 nt, 64 aa) (*Methods*) to construct *xerD*_{γNg}. XerD_{γNg} was purified and shown to bind both *dif*_{Ng} and *dif*_{GGI} (*Methods* and Fig. S1A and D).

HJ Intermediates Characterization. In vitro assays performed by incubating, on a long enough period (1 h) (*Methods*), *dif*_{Ng}-*dif*_{Ng} containing plasmids (pFF1) with XerC_{Ng} and XerD_{Ng} resulted in the appearance of a faint quantity of branched DNA, predicted to contain a HJ intermediate (Fig. 4B, *Left*). To test this hypothesis, the recombination reactions were performed on shorter times (10 min) but supplemented with 10 μM of the WRWYCR peptide, which is known to block XerCD-*dif* recombination at the HJ step (34).

Results presented in Fig. S2B show that a faint quantity of branched DNA is only observed in presence of the peptide. This finding suggests that this branched DNA accumulates in presence

of the peptide, consistent with the fact that it contains a HJ intermediate. Note that the same result was obtained with a *dif*_{Ng}-*dif*_{GGI} containing plasmid (pFF3), although no HJ was observed in absence of peptide (Fig. 4C), suggesting a very weak HJ formation activity on this substrate (or a rapid backward reaction). To further demonstrate the presence of HJ, we performed a differential restriction analysis (Fig. S2C). In this experiment, we used XerD_{γNg} and 20-min incubation times at 37 °C to increase HJ formation. When NcoI was used to digest the product of the reaction, the branched DNA migrated between the linear and the supercoiled forms of pFF1 (Fig. S2C, lane 3, HJα). However, when NcoI and SacI were used together to digest the product of the reaction, the branched DNA migrated more slowly (Fig. S2C, lane 5, HJχ). Again, this result is consistent with HJ formation. Finally, to test if this HJ is an intermediate of the XerCD_{Ng}-*dif* recombination, we used a catalytically defective variant of XerD_{γNg} (XerD_{γYFNg}) in which the catalytic tyrosine is replaced by a phenylalanine. As predicted, this variant is unable to form HJ intermediate (Fig. S2, compare lane 6 with lane 7 and lane 8 with lane 9). Taken together, these results show that the species identified as branched DNA effectively contains a HJ intermediates and that HJs are mostly formed by FtsK_{γNg}-induced XerD_{Ng} catalysis.

Translocation Stoppage Controls. To control that the magnetic pull-down assay we are using (Fig. 6) is specific to the translocation activity of t-FtsKαβγ_{Ec}, we performed the experiment: (i) with increasing amounts of BSA, (ii) with increasing amounts of ATP, and (iii) with increasing amounts of t-FtsKαβγ_{Ec} (Fig. S4B). Results show that free DNA only increased in presence of ATP and t-FtsKαβγ_{Ec}. Furthermore, the amount of free DNA increased as the concentration of t-FtsKαβγ_{Ec} or ATP increased in the reaction. These results are consistent with the fact that the increasing of free DNA is because of t-FtsKαβγ_{Ec} translocation activity.



c- Résultats complémentaires: comportement d'une cassette dif_{GGI}- dif_{GGI} en TPM et recombinaison in vitro

Dans la publication présentée dans le chapitre précédent, les résultats décrits et interprétés se rapportent à la comparaison de deux cassettes de délétion. Ces deux cassettes miment soit un dimère de chromosome (*dif_{Ng}-dif_{Ng}*) soit la forme intégrée du GGI (*dif_{Ng}-dif_{GGI}*). Dans l'optique de comprendre plus finement l'effet de la divergence du bras XerD de *dif_{GGI}*, une cassette *dif_{GGI}-dif_{GGI}* a été construite et testée pour la formation de synapse ainsi que pour son activité de recombinaison.

La formation de synapse de recombinaison est observée à l'aide de l'HT-TPM (High Throughput Tethered Particle Motion) (Figure 11). La longueur de l'ADN utilisée contenant la cassette *dif_{GGI}-dif_{GGI}* est de 2 311 pb et les deux sites sont séparés de 945 pb. Les analyses sont faites soit à 10 minutes, soit à 20 minutes après injection des protéines. L'ajout de XerC_{Ng} et XerD_{Ng} sur cette molécule d'ADN n'entraîne pas la modification de l'Aeq (Figure 11 A). Par comparaison avec les résultats obtenus lors de l'étude du mécanisme d'excision du GGI, ces diminutions correspondent à la formation de la synapse, ou même à la fixation de XerD_{Ng} sur les sites de recombinaison (Fournes et al., 2016). Deux sites *dif_{GGI}*, contenus dans la molécule étudiée, ne permettent donc pas d'observer de modifications de l'Aeq dues à la formation de complexes ADN/protéines. La même expérience a été réalisée en utilisant cette fois XerC_{Ng} et la fusion XerD_{γNg} (Figure 11 B). Dans ce cas là, sur une analyse à 10 minutes après injection des protéines, deux pics sont observés. Le premier pic, correspondant à 90% de la probabilité de densité et présente une diminution de l'Aeq réduite de 30 nm. Cette mesure ne correspond pas à la formation d'une synapse de recombinaison (Figure 11 B). Pour l'étude du système d'*Escherichia coli*, cette première diminution de l'Aeq est corrélée à la fixation de XerD_{Ec} sur les sites de recombinaison (Diagne et al., 2014). La diminution observée sur une molécule contenant la cassette *dif_{GGI}-dif_{GGI}* est plus grande que celle observée pour la fixation de XerD_{Ec}. Toutefois, elle pourrait correspondre à la fixation de XerD_{γNg} sur les sites de recombinaison *dif_{GGI}*. La fixation de XerD_{γNg} pourrait entraîner une conformation différente de la molécule d'ADN et ainsi impacter l'Aeq observée. Pour l'analyse à 10 minutes après injection des protéines, un second pic est observé, il

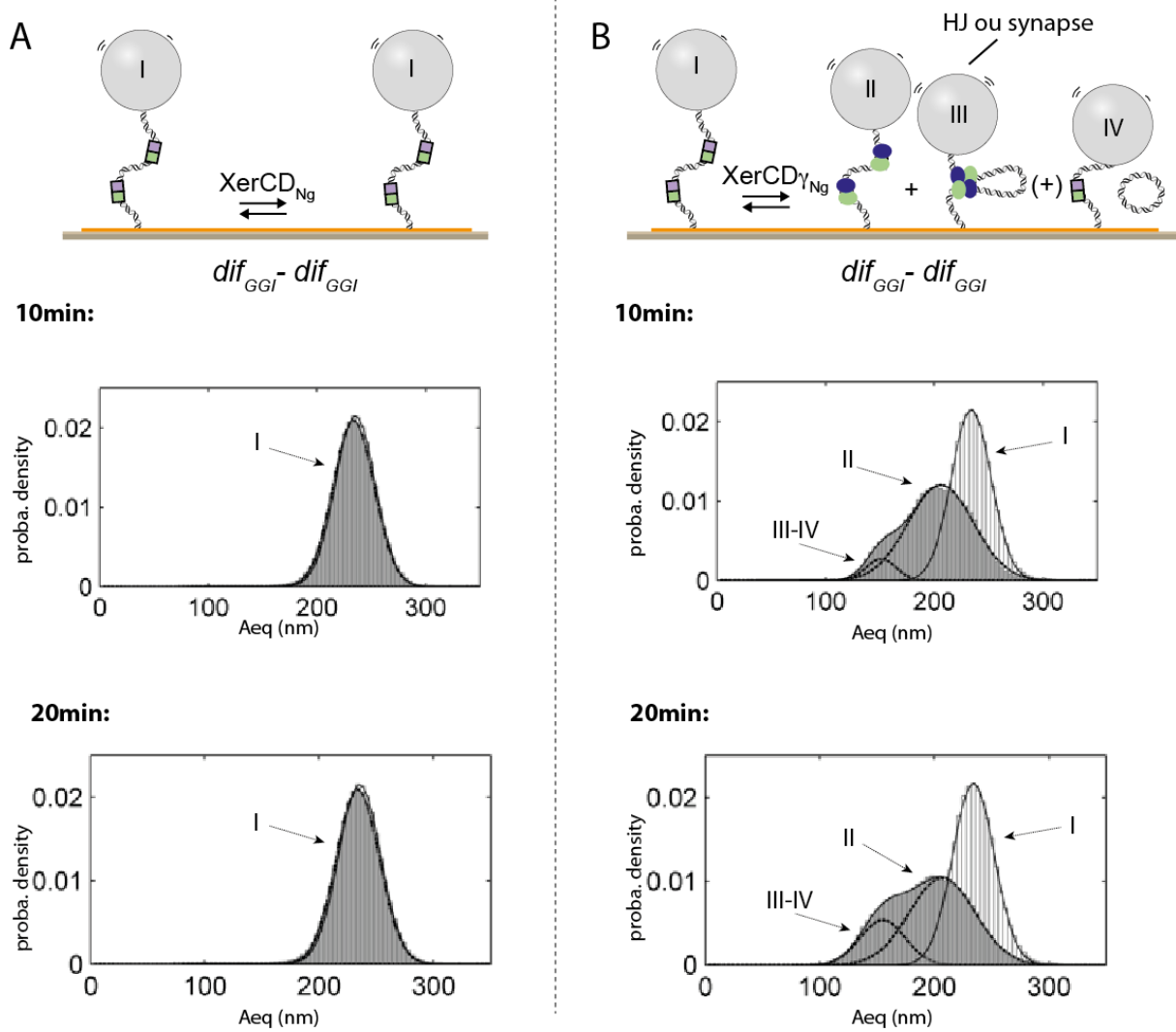


Figure 11 : Comportement de la cassette $\text{dif}_{\text{GGI}}-\text{dif}_{\text{GGI}}$ en HT-TPM. **A et B**: Haut de la figure : La molécule d'ADN contenant deux sites dif_{GGI} (carrés verts et violets) est fixée à une lame de verre (trait gris) par une interaction neutravidine (trait orange)/biotine. La bille de latex est représentée par un cercle gris clair et est fixée à l'ADN par une interaction Digoxigénine/anti- Digoxigénine. Bas de la figure, probabilité de densité des Aeq lorsque l'analyse est faite 10 ou 20 minutes après injection de XerCD_{Ng} ou de XerCD_{Ng} . La gaussienne en gris clair correspond à l'analyse avant injection des protéines. La gaussienne en gris foncé correspond à l'analyse après injection des recombinases. La forme de la molécule d'ADN (I-II-III-IV) correspondant au type de gaussienne observé est représentée. **A** : Les protéines ajoutées sont XerC_{Ng} et XerD_{Ng} . Pour cette étude, les deux gaussiennes (gris clair et gris foncé) se superposent. **B** : Les protéines ajoutées sont XerC_{Ng} et XerD_{Ng} . Haut de la figure : XerC_{Ng} est représentée par un cercle vert et XerD_{Ng} par un cercle bleu foncé. La formation de la jonction de holliday est indiquée ainsi que la catalyse d'une réaction de recombinaison complète.

correspond à 10% de la probabilité de densité et présente une diminution de l'Aeq de 80 nm (Figure 11 B). Dans les mêmes conditions expérimentales, pour des cassettes *dif_{Ng}-dif_{Ng}* ou *dif_{Ng}-dif_{GGL}*, les résultats de formation de synapse présentent une diminution de l'Aeq de 60 nm (Fournes et al., 2016). Les résultats obtenus avec le système d'*E.coli* montrent que lorsque l'on utilise XerD γ_{Ec} , la formation du complexe, résistant à un traitement au SDS, entraîne une diminution de l'Aeq plus importante que la formation d'une synapse (Diagne et al., 2014). Le SDS étant un détergent, il détruit les interactions ADN/protéines. Les complexes observés après traitement au SDS, avec le système d'*E.coli*, correspondent donc à un produit de recombinaison. Par comparaison avec ces résultats, il semblerait que le pic arborant une Aeq d'environ 155 nm obtenu avec XerD γ_{Ng} soit la conséquence d'un événement de recombinaison entre les deux sites *dif_{GGL}* présents. Nous pouvons observer que ce pic a une probabilité de densité qui passe à 30% lorsque l'analyse est faite au bout de 20 minutes (Figure 11 B). Il y aurait donc accumulation au cours du temps de produits de recombinaison partielle (Jonction de Holliday) ou totale. La différence entre les deux ne peut pas être observée à l'aide du TPM.

Dans le but de vérifier si la réaction de recombinaison totale est possible, la cassette *dif_{GGL}-dif_{GGL}* a été testée en recombinaison *in vitro*. Ce test permet d'observer les produits de recombinaison (HJ, P1 et P2) par électrophorèse. Les résultats sont présentés en Figure 12. Lorsque le plasmide contenant la cassette *dif_{GGL}-dif_{GGL}* est incubé seul, on observe le substrat digéré ou partiellement digéré. En présence de XerC $_{Ng}$ et XerD $_{Ng}$, aucun produit de recombinaison n'est observé. En revanche, lorsque l'on substitue XerD $_{Ng}$ par XerD γ_{Ng} l'ensemble des produits sont observés: la jonction de Holliday, P1 et P2. La réaction de recombinaison complète est donc possible entre deux sites *dif_{GGL}*. De plus, la réaction est dépendante de la présence du domaine γ de FtsK $_{Ng}$.

L'ensemble de ces résultats montre que la synapse de recombinaison formée entre deux sites *dif_{GGL}*, en présence de XerC $_{Ng}$ et XerD $_{Ng}$, n'est pas stable. Toutefois, le premier échange de brin amenant à une réaction complète est possible grâce à la présence du domaine γ de FtsK $_{Ng}$. Les expériences de HT-TPM montrent que les produits de recombinaison s'accumulent au cours du temps. Nous pouvons en conclure que la rencontre des deux sites et la formation de la synapse de recombinaison sont toutefois

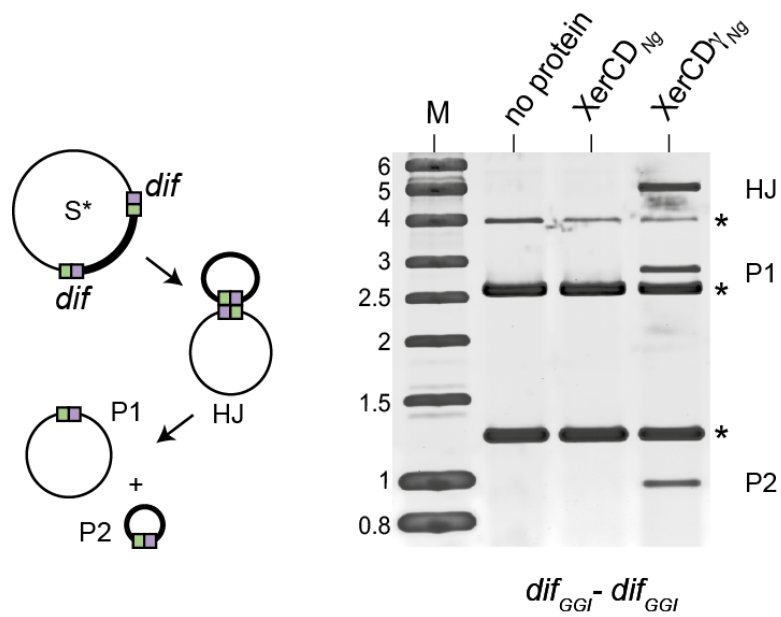


Figure 12 : Recombinaison *in vitro* entre deux sites *dif_{GGI}*. La réaction est schématisée à gauche du gel et permet de visualiser les différents produits de la recombinaison. Gel de gauche : après traitement par deux enzymes de restriction (NcoI et ScaI), le substrats et les produits de recombinaison (HJ, P1 et P2) sont séparés par électrophorèse.

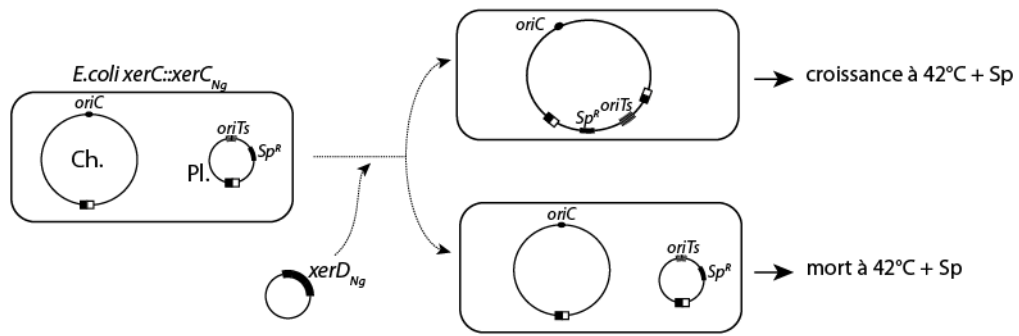
possibles. Comme la formation de la synapse n'est pas observée en HRT-TPM, il est possible qu'elle se forme et se disloque dans un temps inférieur à la résolution temporelle de la technique. Quel est donc la conséquence de l'ajout du domaine γ de FtsK dans les expériences de HT-TPM? Deux hypothèses peuvent être soulevées. Premièrement le domaine γ aiderait à la formation de la synapse. Cette théorie a été développée pour le système de résolution des dimères de chromosome d'*Escherichia coli* (Diagne et al., 2014). Pour cela, FtsK $_{\gamma Ng}$ devrait rendre la fixation de XerD $_{Ng}$ plus affine, permettant la formation d'une synapse plus stable. Deuxièmement, la fusion XerD $_{\gamma Ng}$ catalyserait le premier échange de brin plus rapidement que la synapse se disloquerait. Ainsi ce que l'on observe en HT-TPM avec la cassette *dif_{GGI}-dif_{GGI}* correspondrait à une accumulation de produits de recombinaison.

Pour finir, bien que ces résultats ne soient pas rapportés aux mécanismes d'intégration/excision du GGI, il est important de les développer pour la discussion de l'impact des changements de paires de base présents dans *dif_{GGI}* sur la structure du complexe XerCD/*dif*

2. L'activité de translocation de FtsK n'affecte pas l'intégration du GGI.

La forme excisée du GGI est observable, son existence sous forme extra-chromosomique est donc possible (Snyder et al., 2004). Les données présentées lors de l'étude du mécanisme d'excision du GGI montrent que, entre les sites *dif_{Ng}* et *dif_{GGI}* la synapse de recombinaison se forme et qu'elle est stable. La réaction de recombinaison est activée par le sous domaine γ de FtsK lorsque ces deux sites sont portés par la même molécule d'ADN. Dans un contexte *in vivo* et *in vitro*, l'activité de translocation de FtsK inhibe la réaction de recombinaison entre *dif_{Ng}* et *dif_{GGI}*. Cette caractéristique rend la réaction d'excision extrêmement rare, stabilisant la forme intra-chromosomique du GGI (Fournes et al., 2016). La synapse de recombinaison entre *dif_{Ng}* et *dif_{GGI}* est stable suggérant qu'une recombinaison inter-moléculaire est possible. Cette réaction catalyserait l'intégration du GGI. Nous pouvons donc nous demander quel est le

A



B

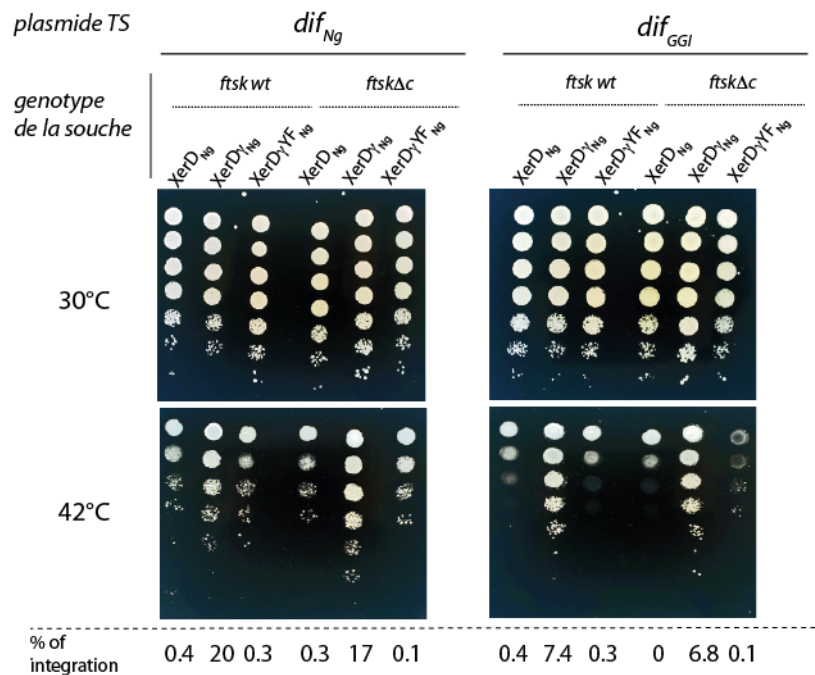


Figure 13 : Mécanisme d'intégration du GGI. **A** : Schématisation du test utilisé pour étudier le mécanisme d'intégration du GGI. Le génotype de la souche est indiqué. Le chromosome et le plasmide sont représentés par des cercles vides noirs. (Ch. : chromosome, Pl. : plasmide). L'origine de réplication du chromosome est notée *oriC* et l'origine de réplication thermosensible du plasmide est notée *oriTs*. Les sites de recombinaison sont représentés par deux carrés noirs et blancs. La résistance à la spectinomycine portée par le plasmide est notée *Sp^R*. La transformation de la souche par les différents variants de *xerD_{Ng}* entraîne l'intégration ou non du plasmide thermosensible au chromosome. L'intégration du plasmide permet la survie des bactéries à 42°C sur un milieu additionné de spectinomycine. Dans le cas contraire, à 42°C le plasmide ne se réplique plus et entraîne la mort de la cellule. **B** : Le site de recombinaison présent sur le plasmide (TS) qui porte une origine de réplication thermosensible est indiqué en haut. Le génotype de la souche ainsi que les variants de *xerD_{Ng}* utilisés sont indiqués en dessous. Les différentes dilutions en série jusqu'à 10⁻⁶ (de haut en bas sur les photos) sont mises en culture sur milieu solide additionné de spectinomycine à 30°C ou 42°C. Les résultats obtenus sont quantifiés (*cf.* Resultats A II 2.) et les pourcentages correspondants sont indiqués en dessous des photos.

mécanisme qui a permis l'intégration du GGI au chromosome de *Neisseria gonorrhoeae*. Nous pouvons aussi nous demander si l'activité de translocation de FtsK aura le même effet d'inhibition sur la réaction d'intégration que sur la réaction d'excision.

Un test d'intégration (Figure 13) a été développé chez *Escherichia coli* pour répondre à ces deux questions. Ce test repose sur l'intégration d'un plasmide par recombinaison spécifique de site entre deux sites *dif*. Ce plasmide porte une origine de répllication thermo-sensible et un gène qui code pour la résistance à la spectinomycine. Deux versions du plasmide ont été contruites, une portant le site *dif_{GGI}* et l'autre portant le site *dif_{Ng}*. Dans le cas où le plasmide se serait intégré au chromosome de sa bactérie hôte, elle aura la capacité de former une colonie à 42°C sur un milieu additionné de spectinomycine. Dans le cas contraire (sans intégration), aucune colonie ne se formera. Ce test a été fait dans une souche d'*E.coli* délétée de son site *dif* endogène (*dif_{Ec}*) et des gènes *xerC_{Ec}* et *xerD_{Ec}*. Le site *dif_{Ec}* est remplacé au locus par *dif_{Ng}*, le gène *xerC_{Ec}* est lui remplacé par le gène qui code XerC_{Ng}. Le gène *xerD_{Ec}* est complémenté en *trans*, à l'aide d'un plasmide portant les différentes versions du gène *xerD_{Ng}*: *xerD_{Ng}*, *xerD_{γNg}*, *xerD_{γYFNg}* (Figure 13 A).

En ce qui concerne l'intégration du plasmide qui porte *dif_{Ng}*, la souche décrite a été transformée à l'aide de plasmide portant le gène qui code soit XerD_{Ng}, soit XerD_{γNg} (mutant constitutivement actif) soit XerD_{γYFNg} (mutant catalytiquement mort). Différentes dilutions en série, jusqu'à 10⁻⁶, sont spotées et mises en culture à 30°C ou à 42°C. La culture à 30°C correspond au témoin de croissance des différentes souches étudiées et la culture à 42°C nous permet d'observer l'intégration du plasmide (Figure 13 B). Toutes les souches étudiées forment des colonies jusqu'à une dilution de 10⁻⁶, à une température de 30°C. A 42°C, on observe qu'une souche complémentée avec *xerD_{Ng}* forme des colonies jusqu'à une dilution de 10⁻³. En revanche, en complémentant avec *xerD_{γNg}*, on observe la formation de colonies jusqu'à une dilution 10⁻⁵ (Figure 13 B). Le domaine *γ_{Ng}* porté par FtsK_{Ng} est le domaine activateur de la recombinaison. Cette observation signifie donc que l'intégration d'un plasmide portant le site *dif_{Ng}* nécessite l'activation de XerD_{Ng} par FtsK_{γNg}. En utilisant le mutant catalytique de XerD_{γNg} on obtient le même résultat qu'avec XerD_{Ng} (Figure 13 B). L'activité catalytique de XerD_{Ng} ainsi que son activation par FtsK_{γNg} sont donc nécessaires à l'intégration du plasmide

thermo-sensible. Ces résultats décrits sont identiques que la souche soit sauvage pour FtsK_{Ec} ou que le domaine C-terminal soit délété (Figure 13 B). L'activité de translocation de FtsK_{Ec} contenue dans le domaine C-terminal n'empêche donc pas la recombinaison inter-moléculaire qui catalyse l'intégration du plasmide. Nous observons les mêmes résultats lorsque l'étude est faite avec le plasmide thermo-sensible portant le site *dif_{GGI}*. L'intégration d'un plasmide qui porte *dif_{GGI}* au chromosome portant *dif_{Ng}* mime l'intégration du GGI. Cette réaction d'intégration semble dépendante de la présence du domaine γ de FtsK_{Ng} et de l'activité catalytique de XerD_{Ng}. La réaction de recombinaison inter-moléculaire entre *dif_{Ng}* et *dif_{GGI}* nécessite donc que XerD_{Ng} soit catalytiquement actif et activé par FtsK γ _{Ng}. De plus, aucune différence n'est observée en présence ou absence du domaine C-terminal de FtsK_{Ec}. L'activité de translocation ne semble donc pas inhiber cette réaction (Figure 13 B).

La quantification de ces événements d'intégration nous apporte une vision plus précise. Le pourcentage d'intégration correspond au rapport du nombre de transformants capables de croître à 42°C sur le nombre de transformants qui poussent à 30°C que l'on multiplie par 100. Les résultats obtenus sont en accord avec les résultats présentés précédemment. Avec un plasmide contenant un site *dif_{Ng}* on obtient un taux d'intégration proche de zéro lorsque on utilise XerD_{Ng} ou son mutant catalytique. Ce taux d'intégration passe à un pourcentage d'environ 20 lorsque XerD γ _{Ng} est utilisé. Ce pourcentage semble le même que la quantification soit faite dans une souche délétée, ou non, du domaine C-terminal de FtsK (Figure 13 B). Lorsque l'intégration d'un plasmide portant un site *dif_{GGI}* est quantifiée, on obtient un taux d'environ 7%. Ce pourcentage est identique en présence ou absence du domaine C-terminal de FtsK (Figure 13 B).

L'ensemble de ces résultats montre que le GGI, a la capacité de s'intégrer au chromosome de sa bactérie hôte: *Neisseria gonorrhoeae*. L'intégration du GGI correspond à une réaction de recombinaison spécifique de site inter-moléculaire entre *dif_{Ng}* et *dif_{GGI}*. Cette intégration est médiée par un mécanisme de recombinaison identique à son excision. En effet, la réaction d'intégration nécessite l'activation de XerD par le domaine γ de FtsK_{Ng}. Toutefois, une différence importante existe entre l'intégration et l'excision du GGI. Le domaine C-terminal de FtsK contenant le moteur de la translocation qui inhibe l'excision du GGI. Ce phénomène est la conséquence de la

destruction d'un complexe $\text{XerCD}_{\text{Ng}}/\text{dif}_{\text{GGI}}$ lorsque le site de recombinaison se trouve sur le chromosome (Fournes et al., 2016). Cette activité, liée à la translocation, semble n'avoir aucun effet sur la réaction de recombinaison catalysant l'intégration du GGI.

III-Discussion

1. Les IMEXs de classe III

Les IMEXs sont divisés en trois classes selon la nature de leur site de recombinaison. La nature des sites de recombinaison a pour conséquence un mécanisme d'intégration/excision différent pour chaque classe d'IMEX (pour revue: Midonet and Barre, 2014). Le site de recombinaison spécifique de site porté par le GGI (dif_{GGI}) présente un bras de fixation pour XerD altéré (Figure 10). Il est donc classé en tant qu'IMEX de classe III (Figure 7). La classe III des IMEXs est la plus variée, elle regroupe des bactériophages, des plasmides et des îlots génomiques (Das et al., 2013). Le paradigme de cette classe est le bactériophage TLC qui s'intègre au chromosome de *Vibrio Cholerae* (Figure 7 et 8) (pour revue: Das et al., 2013). Même si les IMEXs TLC et GGI font partie de la classe III, ils ont des mécanismes d'intégration/excision différents. Pour le mécanisme de TLC, XerD catalyse le premier échange de brin, indépendamment de l'activation par FtsK. Les divergences du bras de fixation de XerD entre le site dif de *V. cholerae* et att_{TLC} empêchent la fixation de XerD seule. Toutefois, la formation du complexe $att_{TLC}/XerCD_{Vc}$ est possible (Midonet et al., 2014). J'ai montré que la mobilité du GGI, quant à elle, est dépendante de l'activation de XerD par FtsK. Les divergences entre dif_{Ng} et dif_{GGI} n'empêchent pas la fixation de XerD seule (Figure 10) (Fournes et al., 2016). D'un point de vue mécanistique, il semblerait que l'on ne puisse pas classer le GGI en tant qu'IMEX de classe III. Cependant, une caractéristique leur est commune. Bien que leur excision soit démontrée, elle reste extrêmement rare et leur forme intra-chromosomique est stable. J'ai montré que pour le GGI, cette stabilité est dépendante de l'activité de translocation de FtsK. FtsK *via* son activité de translocation détruit un complexe $XerCD_{Ng}/dif_{GGI}$ alors qu'elle s'arrête spécifiquement sur un complexe $XerCD_{Ng}/dif_{Ng}$ (Figure 14). La destruction du complexe $XerCD_{Ng}/dif_{GGI}$ inhibe la recombinaison entre le site dif endogène (dif_{Ng}) et le dif importé par l'élément génétique mobile (dif_{GGI}) (Fournes et al., 2016) (Figure 14). La cause de cette inhibition est l'altération du bras de fixation pour XerD de dif_{GGI} . Les 4 paires de bases divergentes de

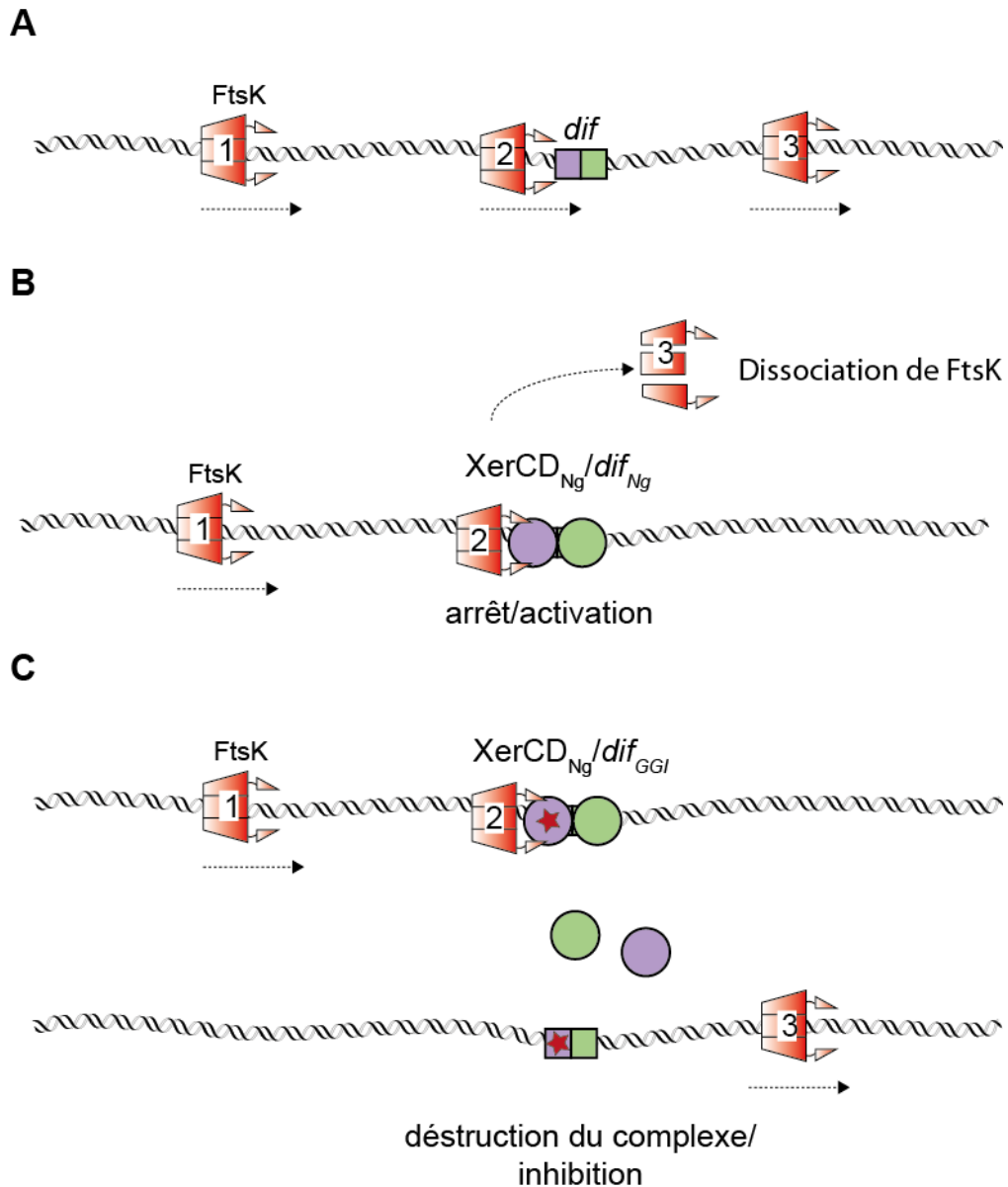


Figure 14 : Modèle d'interaction entre les complexes XerCD_{Ng}/dif du système Xer de *Neisseria gonorrhoeae* et FtsK. Le trapèze orange correspond aux domaines α et β de FtsK hexasomérisés sur l'ADN. Le domaine γ de FtsK est représenté par un triangle orange. Les sites de recombinaison correspondent aux carrés violets et verts. Le cercle violet représente XerD qui se fixe sur son bras qui correspond au carré violet. La même représentation est utilisée pour XerC mais en vert. **1 A, B et C** : FtsK transloque sur la molécule d'ADN double brins, sous sa forme hexasomérique. **2 et 3 A** : Les recombinases XerC et XerD ne sont pas fixées sur le site, FtsK continue de transloquer. **2 et 3 B** : FtsK s'arrête sur un complexe XerCD_{Ng}/dif_{Ng}, active la recombinaison et se dissocie. **2 et 3 C** : Les altérations du site dif_{GGL} sont représentées par une étoile rouge. FtsK ne s'arrête pas sur un complexe XerCD_{Ng}/dif_{GGL}, elle le détruit et inhibe la réaction de recombinaison

dif_{GGI}, changeraient la conformation du complexe XerCD_{Ng}/*dif_{GGI}* qui ne serait plus reconnu par FtsK (*cf.* B III 3). Comme le bactériophage TLC porte un site de recombinaison avec le même type d'altération, il serait possible que sa stabilité soit aussi due à l'activité de translocation de FtsK.

L'îlot génomique GGI dont le mécanisme d'intégration/excision a été étudié provient de la souche de *Neisseria gonorrhoeae* MS11. Cette forme du GGI est la plus répandue et est présente chez 80% des souches pathogènes de gonocoques (Dominguez et al., 2011) (Snyder et al., 2004). Le GGI est moins présent chez *Neisseria meningitidis*, on le retrouve dans 17,5% des souches provenant d'isolats cliniques (Snyder et al., 2005). Il existe deux variants principaux du GGI chez les meningocoques. Ces différents variants du GGI ont été classés en fonction des gènes qu'ils portent et en fonction de leur site de recombinaison. Un porte un site *dif_{GGI1}* divergent du site *dif* endogène au niveau de 8 pb du bras de fixation pour XerD (Figure 10). L'autre (*dif_{GGI2}*), est divergent de seulement 3 pb au niveau de son bras de fixation pour XerD (Figure 10). Une analyse par mutagenèse dirigée, pour transformer le site *dif_{GGI}* étudié en site endogène (*dif_{Ng}*), a permis de montrer que chaque base semblait être importante pour la stabilité intrachromosomique du GGI (données non montrées). Bien que chacune de ces bases semble avoir une importance différente, une divergence en moins sur le bras de fixation de XerD du GGI pourrait augmenter le taux de son excision. Il existe plusieurs sites de recombinaison portés par les différents variants du GGI. L'efficacité de leurs taux d'intégration/excision pourrait être plus ou moins importante. Notamment, le variant du GGI présent chez les meningocoques, porte un site de recombinaison divergent de 3 pb (Figure 10). Le taux d'excision de ce variant du GGI pourrait être supérieur à celui du GGI présent dans la souche de *Neisseria gonorrhoeae* MS11. Ce variant qui porte le site de recombinaison *dif_{GGI2}* serait en train de se disséminer chez les meningocoques.

2. Activité différentielle de FtsK sur les mécanismes d'intégration et d'excision du GGI

FtsK est une translocase à ADN aux fonctions multiples qui ont été décrites dans l'introduction. Via son activité de translocation, j'ai montré qu'elle a la capacité de faire la différence entre un site *dif* endogène de résolution des dimères de chromosomes et un site importé par un élément génétique mobile (Figure 14). Ce phénomène a pour conséquence l'inhibition de la réaction de recombinaison intra-moléculaire médiant l'excision du GGI (Fournes et al., 2016). Cette activité d'inhibition n'est pas retrouvée sur la réaction inter-moléculaire catalysant l'intégration d'un plasmide contenant le site *dif_{GGI}* (Figure 13). Comment expliquer que l'activité de translocation de FtsK n'ait pas le même effet sur la recombinaison entre deux mêmes sites qu'ils soient sur la même molécule ou sur deux molécules différentes ? Il est tout à fait possible que lors de la réaction de recombinaison inter-moléculaire, FtsK ne rencontre que le site se trouvant sur le chromosome (*dif_{Ng}*). Le site *dif_{GGI}* se trouvant sur la forme excisée circulaire du GGI, ne serait pas "vu" par FtsK. Cette hypothèse sous-entend que FtsK ne s'hexamérise pas et ne transloque pas sur la forme extra-chromosomique du GGI. L'absence de phénomène d'inhibition lors de la réaction inter-moléculaire, souligne que l'activité d'inhibition de FtsK se limiterait à la molécule sur laquelle elle transloque. Une seconde hypothèse ne doit pas être oubliée : il serait aussi possible que la topologie de la synapse formée entre les sites *dif_{Ng}* et *dif_{GGI}* soit différente qu'elle se forme en inter ou intra-moléculaire. Même en présence du site *dif_{GGI}* et de ses altérations, une synapse formée en inter-moléculaire pourrait permettre l'arrêt de FtsK. Toutefois, pour que la réaction de recombinaison catalysant l'intégration ait lieu, le domaine γ de FtsK doit avoir la capacité d'activer la recombinase XerD se trouvant sur le site *dif_{GGI}*. Cette activation implique que la protéine FtsK puisse contacter XerD en *trans*: se trouvant sur une autre molécule que celle sur laquelle FtsK transloque. Aucune donnée expérimentale n'est encore disponible, mais certaines informations semblent montrer que l'activation de XerD en *trans* est possible. Lorsque le domaine γ de FtsK est fusionné à XerC, il a la capacité d'activer XerD pour la catalyse du premier échange de brin (Grainge et al., 2011). Dans la synapse de recombinaison, XerC γ pourrait activer, soit le monomère de XerD qui se trouve sur le même site, soit celui qui se trouve sur l'autre site (*cf.* B.I revue sur FtsK). De plus, la longueur en acides aminés du linker entre les sous domaines α et β et le sous domaine γ semble assez long pour permettre l'activation de XerD en *trans* (Löwe et al., 2008).

Pour résumer, que ce soit pour la translocation ou l'activation par contact avec XerD, les activités de FtsK semblent avoir des portées différentes. L'inhibition de la recombinaison entre un site endogène et un site importé ne semble pouvoir se faire que en *cis*. Au contraire, l'activation de la recombinaison semblerait pouvoir se faire en *cis* et en *trans*.

3. Impact des divergences de *dif_{GGI}* sur le complexe XerCD/*dif*

Nous venons de voir et de discuter de l'effet de la translocation de FtsK lorsque la protéine arrive sur un complexe XerCD/*dif_{GGI}*. Quand FtsK arrive sur le site *dif_{GGI}* elle détruit le complexe qui s'y forme (Figure 14). Or, normalement FtsK s'arrête de manière spécifique sur un complexe XerCD/*dif* (Graham et al., 2010). FtsK ne reconnaît donc pas *dif_{GGI}* comme étant un site de recombinaison où elle doit s'arrêter pour activer la recombinaison. Pourtant, aucune différence n'est observable ni lors des expériences de coopérativité en retard sur gel, ni sur la stabilité des synapses de recombinaison en HT-TPM. Donc, normalement FtsK devrait s'arrêter sur un complexe XerCD/*dif_{GGI}*. Toutefois, en étudiant le comportement d'une cassette *dif_{GGI}-dif_{GGI}* mais aussi en se penchant sur les données obtenues en retard sur gel, lorsque les recombinases sont utilisées seules, un certain nombre de différences sont notables et pourraient nous apporter un début de réponse.

Premièrement, en retard sur gel, lorsque XerD_{Ng} est incubée seule avec un ADN contenant *dif_{GGI}* elle ne permet pas la formation d'un complexe *dif-Xer²*, comme elle le fait sur *dif_{Ng}* (Cf. Fournes et al., 2016, SI text et FigS1). De plus l'affinité de XerD_{Ng} seule pour *dif_{GGI}* est plus faible que pour *dif_{Ng}*. Il semblerait donc que XerD_{Ng} ait un comportement différent en présence de *dif_{Ng}* ou de *dif_{GGI}*.

Deuxièmement, lors des expériences faites en HT-TPM sur les cassettes *dif_{Ng}-dif_{Ng}* et *dif_{Ng}-dif_{GGI}*, en ajoutant XerCD_{Ng} on observe, outre la formation de la synapse, une diminution de l'Aeq qui pourrait être la conséquence de la fixation des recombinases sur les sites de recombinaison. Bien que ce ne soit pas démontré expérimentalement, cette

diminution d'Aeq pourrait être due à une courbure de l'ADN induite par les recombinaisons. L'étude en TPM de la formation de la synapse de recombinaison du système XerCD/*dif* d'*Escherichia coli* nous apporte des informations supplémentaires. Cette diminution de l'Aeq est visible sur un ADN contenant deux sites *dif_{Ec}* en présence de XerD_{Ec} et non en présence de XerC_{Ec}. Cette observation permet de penser que XerD est capable de courber la molécule d'ADN contenant *dif*. XerC n'en serait pas capable (Diagne et al., 2014) (Thèse Diagne Cheikh). Cette diminution de l'Aeq n'est pas observée lorsque l'étude est faite sur une cassette *dif_{GGI}-dif_{GGI}*. La présence de deux sites de recombinaison avec des bras de fixation pour XerD divergents ne permettrait pas la courbure de l'ADN. De plus, la synapse de recombinaison *dif_{GGI}-dif_{GGI}* n'est pas observée en HT-TPM en présence de XerCD_{Ng}. Lorsque l'on substitue XerD_{Ng} par XerD_{γNg} on observe la formation de produits issus de la recombinaison *dif_{GGI}-dif_{GGI}*. L'ensemble de ces données crée une corrélation entre l'effet de XerD seule sur un site de recombinaison et la stabilité de la synapse de recombinaison. Pour résumer, les altérations de *dif_{GGI}* ne permettraient pas la courbure induite par XerD impliquée dans la stabilité de la synapse de recombinaison

Ces observations, issues des résultats obtenus en gel retard et HT-TPM, mettent en avant les différences de complexes existants entre *dif_{Ng}* et *dif_{GGI}*. Les 4 pb divergentes de *dif_{GGI}* ne permettraient donc pas une courbure de l'ADN. Et bien qu'une synapse *dif_{Ng}-dif_{GGI}* soit assez stable, l'absence de courbure induite par XerD_{Ng} sur *dif_{GGI}* empêcherait la reconnaissance du complexe par FtsK. Une caractérisation structurale des complexes XerCD/*dif* avant et après formation de la synapse de recombinaison est donc indispensable. En ce qui concerne la caractérisation des complexes avant la formation de la synapse, il serait possible de les étudier en HT-TPM. En effet un angle induit localement sur une molécule d'ADN peut être calculé à l'aide de cette technique. Cette méthode de calcul a été développée en utilisant une molécule d'ADN modifiée contenant des répétitions en phase de une à sept répétitions de 6A-tracts (Brunet et al., 2015) (Marini et al., 1984). Cette fonction de l'HT-TPM nous donne la capacité de calculer la courbure supposée de l'ADN induite par la fixation des recombinaisons sur les sites de recombinaison. De telles possibilités de mesures permettraient d'observer et de quantifier les différences entre les complexes formés sur des sites endogènes (*e.g. dif_{Ng}*) ou des sites importés (*e.g. dif_{GGI}*).

De plus, la réaction de recombinaison est possible et a été démontrée entre deux sites *dif_{GGI}* à l'aide de la fusion entre XerD_{Ng} et FtsK_{Ng} (B II, Résultats complémentaires). Nous pouvons donc penser que ces modifications sur la molécule d'ADN (courbures) sont requises pour l'arrêt de translocation de FtsK mais pas pour l'activation de XerD par FtsK_γ. Or, il semblerait que pour le système d'*E.coli*, le domaine FtsK_γ ne soit pas impliqué dans le mécanisme d'arrêt de translocation de FtsK alors qu'il est indispensable à l'activation de la recombinaison (Grainge et al., 2011) (Graham et al., 2010). Ces études de systèmes XerCD/*dif* d'espèces différentes, *E.coli* et *N.gonorrhoeae*, indiquent que l'arrêt de translocation et l'activation de la recombinaison sont deux activités distinctes. Il semblerait aussi que les domaines de FtsK, mais aussi les interactions ADN/protéines et protéines/protéines, intervenants dans ces deux mécanismes ne soient pas identiques.

C- RESOLUTION DES DIMERES DE PLASMIDE ET MEGA-PLASMIDE

I-Introduction

1. Contrôle de la résolution des dimères de plasmide

a-Présentation

Pour certains systèmes, le site coeur de recombinaison n'est pas suffisant pour permettre une réaction de recombinaison complète. Les sites actifs de ces systèmes comportent des séquences accessoires sur lesquelles viennent se fixer des protéines régulatrices (Figure 3 A). La fixation de protéines accessoires sur ces séquences est nécessaire à la formation d'un complexe de recombinaison fonctionnel. Les protéines et séquences accessoires vont ainsi permettre le rapprochement des deux sites coeur où positionner les recombinases dans une conformation active pour la catalyse. L'architecture spécifique du complexe de recombinaison amène un moyen de contrôle de la réaction, assurant que la recombinaison se fasse dans le bon sens et entre des sites de recombinaison appropriés. Ce contrôle est crucial pour les fonctions biologiques des systèmes de résolution spécifique de site. Il permet d'empêcher la formation de multimères et/ou des réarrangements indésirables de l'ADN. Dans ces systèmes, le choix du mécanisme de recombinaison est imposé par une géométrie locale de l'ADN. Cette géométrie complexe est composée d'un filtre topologique qui empêche la recombinaison entre des sites coeur dans la mauvaise orientation ou la recombinaison entre des sites sur des molécules d'ADN séparées (Guhathakurta et al., 1996). La formation du filtre topologique impliqué dans la résolution des dimères de plasmides, ainsi que les protéines accessoires intervenant pour les plasmides modèles seront décrits dans le chapitre suivant. L'ensemble de ces caractéristiques, relatives au système Xer plasmidique, entraîne la formation de produits de recombinaison qui se distinguent par une topologie simple, conséquence de la forme initiale de la synapse mais aussi du mécanisme d'échange de brins utilisé par les recombinases (Figure 15).

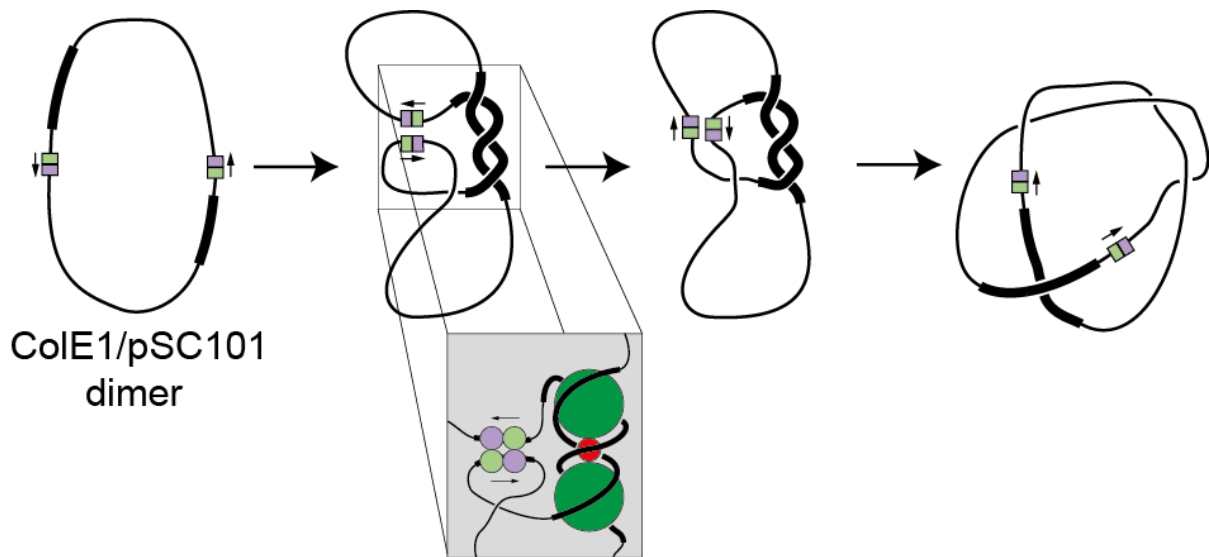


Figure 15 : Topologie de la recombinaison catalysant la résolution des dimères des plasmides ColE1 et pSC101. Les sites de recombinaison sont colorés en vert et violet et les flèches montrent leur orientation. Les séquences accessoires sont en traits plus épais en comparaison du reste de la molécule d'ADN. La configuration précise de la synapse et du filtre topologique sont schématisées. XerC et XerD sont représentées par des cercles vert et violet. PepA correspond au cercle vert foncé et ArgR (ou ArcA pour *psi*) au cercle rouge. Le dernier schéma représente la topologie des produits de la recombinaison Xer aux sites cer et psi (caténane contenant quatre noeuds)

b- Les filtres topologiques et mécanismes de résolution des dimères de plasmide

Seules les recombinases à tyrosine et plus particulièrement le système Xer sont développés dans cette thèse. Néanmoins, il est indispensable de souligner que les recombinases à sérine jouent un rôle important dans la résolution des dimères de plasmides. Ces recombinases à sérines sont présentes chez un grand nombre de plasmides. Certaines ont été décrites comme étant impliquées dans la conversion des multimères en monomères (pour revue: Rice, 2015). Ces systèmes de résolution de plasmides dépendants de recombinases à sérines sont compilés et commentés dans la revue présentée en ANNEXE 1.

Le système Xer peut résoudre les dimères de deux types de réplicons : des chromosomes et des plasmides. Le système Xer assure donc la réaction de recombinaison au site chromosomique *dif* ou aux sites plasmidiques comme *cer* de ColE1 et *psi* de pSC101 (Cornet et al., 1994) (pour revue: Colloms, 2013, Crozat et al., 2014a). Dans le cas de *cer* et de *psi*, la fixation des protéines accessoires (respectivement PepA et ArgR, PepA et ArcA) aux séquences accessoires (Figure 3A) entraîne la formation d'un filtre topologique dans lequel la molécule d'ADN contient trois noeuds négatifs. Un quatrième noeud est introduit pour positionner les deux sites coeur en orientation anti-parallèle (Figure 15). A partir d'études génétiques, structurales et topologiques, un modèle du complexe réactionnel impliquant *cer* a été proposé. Dans ce modèle un hexamère de ArgR (Stirling et al., 1988) est entouré par deux hexamères de PepA (Stirling et al., 1989), et l'ADN contenant les séquences accessoires s'enroule autour des protéines. ArgR rapproche les deux sites coeur de recombinaison en se fixant aux boîtes ArgR de chaque séquence accessoire. PepA semble responsable de la topologie du complexe en orientant l'ADN au travers d'un canal allant de bas en haut de l'hexamère (Alén et al., 1997) (Reijns et al., 2005) (Sträter et al., 1999) (Figure 15). La recombinaison au site *psi* est dépendante de la formation d'un complexe identique dans lequel un hexamère de ArcA remplace celui de ArgR (Colloms et al., 1998) (Bregu et al.,

2002). La mise en place du filtre topologique a des conséquences sur les produits de recombinaison. Entre deux sites *psi*, la présence du filtre topologique entraîne la formation d'un produit intercaténé contenant quatre noeuds. Pour la recombinaison entre deux sites *cer*, la topologie des produits est la même mais contient une jonction de Holliday (Figure 15) (Colloms et al., 1997).

Que ce soit dans le cas de *cer* ou *psi*, la formation de la jonction de Holliday résulte de l'activité catalytique de XerC. Ce premier échange de brin, catalysé par XerC, serait la conséquence des contraintes topologiques imposées par le filtre. Les protéines et séquences accessoires amèneraient le complexe synaptique dans une configuration dans laquelle XerC serait active en premier (Bregu et al., 2002). Pour la réaction de recombinaison au site *cer*, XerD est incapable de catalyser le second échange de brin pour résoudre la jonction de Holliday (Figure 16 A). La réaction de recombinaison est donc bloquée à cette étape. La résolution de la jonction de Holliday au site *cer* serait due au passage de la fourche de réplication, qui sur une molécule dimérique contenant une jonction de Holliday, produirait deux molécules monomériques et une dimérique (Figure 16 B). En ce qui concerne la recombinaison au site *psi*, le second échange de brin qui résout la jonction de Holliday est catalysé par XerD (Bregu et al., 2002) (Hallet et al., 1999) (pour revue: Midonet and Barre, 2014) (Figure 16 C).

2. Effets des dimères de plasmide sur le cycle cellulaire

Les mécanismes de résolution des multimères des plasmides ColE1 et pSC101 utilisent donc les recombinases Xer de leurs hôtes. Ces plasmides restent toutefois indépendants du contrôle spatial et temporel conséquent au cycle cellulaire. Cette situation pourrait avoir des conséquences délétères sur leur stabilité: par exemple, si leurs dimères ne sont pas résolus avant la division cellulaire. Dans le but de palier ce problème sous jacent, les plasmides sont capables de contrôler le cycle cellulaire de leur hôte pour avoir le temps de se répliquer ou résoudre leurs dimères. Le plasmide pSC101 peut influencer le cycle cellulaire via sa protéine de réplication RepA. RepA peut

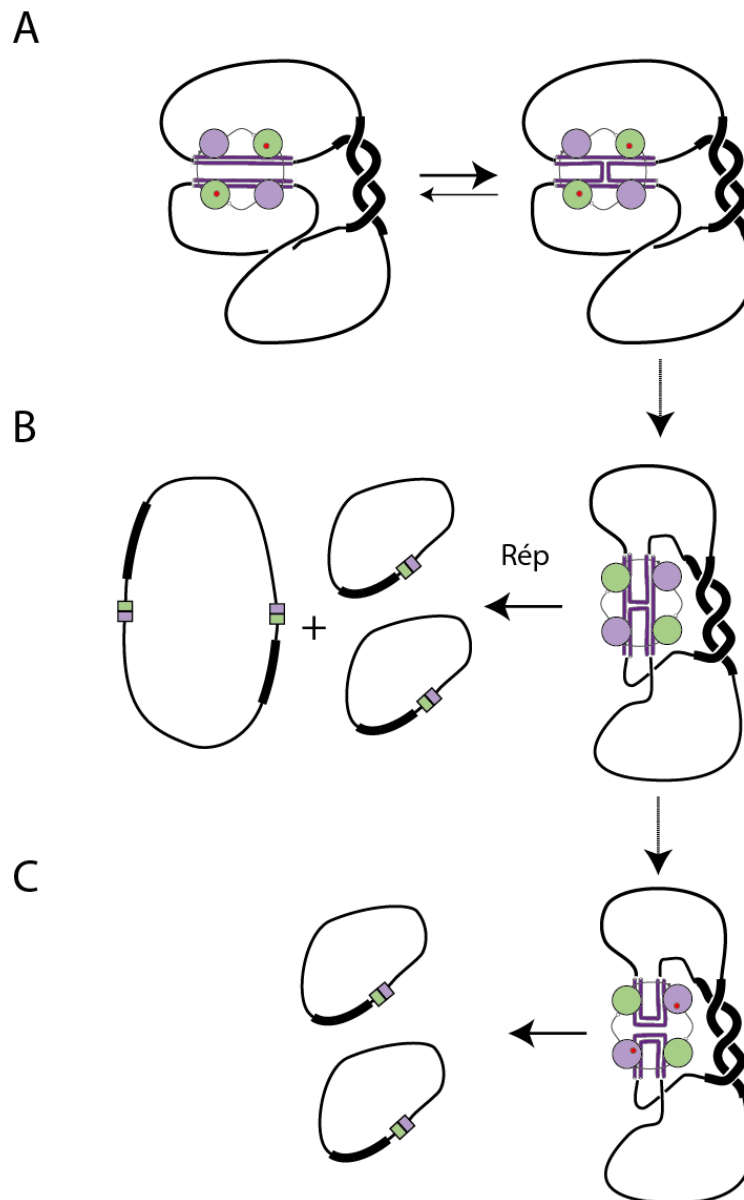


Figure 16 : Mécanisme de résolution des dimères de plasmides. Les codes iconographiques et les codes couleurs utilisés sont identiques à ceux des figures 8 et 15. **A :** Que ce soit pour *cer* ou pour *psi* c'est XerC qui catalyse le premier échange de brins et forme la jonction de Holliday. **B :** pour *cer*, c'est la fourche de réplication (Rép) qui convertit la jonction de Holliday en produits de recombinaison : un dimère et deux monomères. **C :** pour *psi* c'est XerD qui catalyse le second échange de brin et entraîne la formation de deux monomères après décaténation (cf. topologie des produits de recombinaison Figure 15).

induire le système SOS et ralentir la division cellulaire quand le nombre de copies de plasmides diminue. L'induction du système SOS résulte d'un excès de RepA par rapport à son site de fixation. Cet excès de RepA séquestre l'ADN primase DnaG, ce qui entraîne une augmentation de brin retardé non apparié au niveau de la fourche de réplication (Ingmer et al., 2001). Le plasmide ColE1 ne code pas pour une protéine de réplication, mais il a aussi la capacité d'inhiber la division cellulaire quand ses multimères ne sont pas résolus. Le mécanisme est dépendant de l'accumulation de dimères qui entraîne la synthèse d'un petit ARN régulateur: Rcd (Regulator of Cell Division) (Balding et al., 2006) (Sharpe et al., 1999) (Patent and Summers, 1993). Rcd stimule la tryptophanase et augmente la production d'indole ce qui inhibe la division cellulaire (Chimerel et al., 2012) (Chant and Summers, 2007). Ce délai de la division cellulaire ne semble pas être suffisant pour empêcher la catastrophe des dimères (*cf.* Introduction Générale, Chapitre II, Figure 2), il faudrait que la réplication des plasmides soit ralentie. Ce phénomène est aussi possible grâce aux propriétés de l'indole qui stoppe la réplication du plasmide en inhibant l'ADN gyrase (Field and Summers, 2011).

3. Chromosomes secondaires et Méga-plasmides

α -Génèse des chromosomes secondaires

L'origine de réplication du chromosome secondaire (Ch.2) de *V.cholerae*, similaire à celles de plasmides, suggère fortement une domestication de plasmide en composant stable du génome (Harrison et al., 2010). Comment les chromosomes secondaires apparaissent n'est, à ce jour, que très peu étudié. Toutefois, une étude systématique des génomes bactériens ayant un chromosome secondaire a été faite. Elle apporte un certain nombre d'informations concernant la définition des chromosomes secondaires. Cette étude introduit le terme de chromide pour définir les chromosomes secondaires, et les différencier à la fois des chromosomes principaux et des plasmides (Harrison et al., 2010). Il est possible que les plasmides deviennent des chromides par

acquisition de gènes essentiels, avec une perte de la copie originale de ce gène du chromosome principal. Les chromides formés deviennent alors essentiel à la bactérie, ceci les rendant plus proches des chromosomes que des plasmides (Fricke et al., 2009). L'acquisition de gènes essentiels pourrait être la conséquence d'évènements de recombinaison entre un chromosome et un plasmide (Guo et al., 2003). Une des hypothèses, la plus plausible, réside dans la pré-existence d'un chromide, possédant déjà des gènes essentiels ou adaptatifs, qui recombinerait avec un plasmide nouvellement acquis. Cette supposition est en accord avec l'existence d'un cluster de gènes ancestraux identique chez les chromides au travers des différents genres bactériens (Slater et al., 2009) (Harrison et al., 2010).

Tout comme le Ch.2 de *V. cholerae*, l'ensemble des chromides ont un système de réplication plasmidique, mais aussi un système de maintenance de type ParAB (Heidelberg et al., 2000) (Fricke et al., 2009). Trois autres caractéristiques semblent importantes: ils ont une composition en nucléotides proche de celle des chromosomes primaires; portent des gènes qui sont retrouvés dans d'autres espèces bactériennes et sont normalement plus petits que le chromosome tout en étant plus grands que les plasmides (Harrison et al., 2010).

Ces chromides doivent s'adapter aux mécanismes globaux inhérents au cycle cellulaire, une des étapes clés reste le contrôle de la réplication du matériel génétique. Un second point discriminant réside dans le mécanisme de résolution des formes dimériques. Nous venons de voir que le système Xer de résolution de dimères plasmidiques est dépendant de séquences et protéines accessoires qui forment un filtre topologique. Le système de résolution de dimères chromosomique est lui contrôlé *via* son intégration au processus général de ségrégation et de division cellulaire (Croizat et al., 2014a) (*cf.* Partie A Introduction). L'efficacité de la réaction de recombinaison entre deux sites plasmidiques est prédite pour être dépendante de la distance entre les deux sites. Il est donc possible qu'à partir d'une certaine taille le mécanisme de résolution de dimères plasmidiques ne puisse plus être fonctionnel. En accord avec cette caractéristique, le système de résolution de dimères du chromosome secondaire de *Vibrio Cholerae* est dépendant de FtsK (*cf.* Partie B Introduction) (Val et al., 2008). Même si les chromides sont présents chez 10% des espèces bactériennes, aucune autre donnée n'est

disponible, (Harrison et al., 2010). L'augmentation de la taille des réplicons, allant des plasmides vers les chromides, s'accompagnerait d'une restructuration du réplicon. Cette restructuration pourrait correspondre à l'acquisition de réplichores et de séquences orientées répétées (*cf.* Partie B Introduction, revue: Crozat et al., 2014b). L'acquisition de ces caractéristiques est indispensable à un contrôle global de type chromosomique du réplicon. Ce contrôle peut correspondre à la ségrégation du réplicon mais aussi à son système de résolution de dimères (Stouf et al., 2013) (Val et al., 2008) (Val et al., 2014a). Il est donc indispensable de sélectionner des réplicons modèles, sur lesquels nous pourrions étudier le passage d'un système de résolution de dimère plasmidique à un système de résolution de dimère chromosomique.

b- Les mégaplasmides

Les génomes bactériens peuvent donc se retrouver sous différentes formes, et peuvent être composés de différents réplicons: chromosomes, chromides ou plasmides. Les chromosomes principaux ont une taille qui peut varier de 100Kpb à 12Mpb alors que les plasmides qui peuvent représenter jusqu'à 30% du génome ont, la plupart du temps, une taille inférieure à 100 Kpb. Les chromides peuvent avoir des tailles diverses, tout en restant plus petits que le chromosome principal. Bien que la majorité des plasmides soient des éléments génétiques mobiles de petite taille, il existe des plasmides plus grands que certains chromosomes. Ces "mégaplasmides" semblent être un intermédiaire de taille entre plasmides et chromides. Ils permettraient d'analyser les déterminants du fonctionnement des systèmes de résolution de dimères de réplicons. Ces méga-plasmides ne portent pas de gènes essentiels, mais sont les vecteurs d'information génétique adaptative comme la capacité à envahir les cellules eucaryotes pour *Shigella flexneri* (Buchrieser et al., 2000) ou à établir une relation de symbiose avec les plantes chez les Rhizobiales (Marchetti et al., 2010).

Une étude bio-informatique des plasmides d'*E.coli* permet de se pencher sur les plus grands plasmides ou "méga-plasmides" de cette espèce. Les groupes

d'incompatibilités (Inc)⁶ les plus représentés sont IncHI1, IncHI2 et IncF. Les plasmides du groupe d'incompatibilité IncHI1 sont généralement grands, et partagent un génome coeur de 160Kpb. Les différences de taille observées sont la conséquence de la présence de séquences d'insertion (Gilmour et al., 2004) (Wain et al., 2003). De plus, en regardant ces mêmes "mégaplasmides", il apparait que certains d'entre eux ont perdu leur mobilité (de Toro et al., 2014) .

Le plasmide R27 a été isolé à partir d'une souche résistante à la tétracycline de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Sherburne et al., 2000). C'est le prototype des plasmides conjugatifs de la famille IncHI1 (Kubasova et al., 2016), qui sont souvent associés à la multi-résistance aux antibiotiques dans un nombre certain de bactéries pathogènes. R27 a une taille approximative de 180kpb et contient 210 ORF putatifs dont 65% ont des fonctions inconnues. Certaines caractéristiques sont toutefois notables; sa conjugaison est sensible à la température (optimale à 30°C et réprimée à 37°C) (Alonso et al., 2005) (Forns et al., 2005), et il possède deux systèmes de partition, ainsi que deux origines de réplication (Lawley and Taylor, 2003). Les systèmes de partition retrouvés sur R27 sont différents de par leur mécanisme. Le système de type I, correspondant à ParABS, est le plus répandu chez les plasmides à faible nombre de copies, il est aussi retrouvé sur les chromosomes, comme sur le Ch.2 de *V.cholerae*. Il est composé d'un site *parS*, de séquences répétées variables, sur lequel se fixe la protéine ParB sous forme dimérique. L'interaction entre ParB et *parS* entraîne la formation d'un complexe de partition qui interagit par la suite avec la protéine motrice ParA de type ATPase à "Walker box " (Sanchez et al., 2015) (pour revue: Baxter and Funnell, 2014). Le second système, correspond au système de type II, ParRMC, son mécanisme repose sur l'interaction de la protéine ParR avec la séquence *parC*. Dans ce système, ParM est la protéine motrice. Elle possède une structure tri-dimensionnelle similaire à l'actine des eucaryotes, c'est donc une ATPase de type actine (Garner et al., 2004) (Garner et al., 2007) (pour revue: Baxter and Funnell, 2014). En ce qui concerne les origines de réplication, RepHI1A et RepHI2A, elles sont toutes les deux actives lorsqu'elles sont clonées sur des plasmides indépendants. Toutefois, leur rôle sur le plasmide R27

⁶ Inc: Les groupes d'incompatibilité plasmidiques regroupent un ensemble de plasmides que s'excluent mutuellement. Deux plasmides d'un même groupe ne peuvent coexister dans la même bactérie

sauvage reste indéterminé (Saul et al., 1988) (Newnham and Taylor, 1994) (Gabant et al., 1993). Ces deux types d'origines de réplication semblent être retrouvés de manière systématique chez les plasmides IncH, regroupant IncHI1, IncHI2, IncHI3 (Page et al., 2001). De plus, les plasmides de ces trois groupes d'incompatibilité partagent un génome coeur contenant, entre autres, le système de conjugaison. L'ensemble des plasmides appartenant aux sous-groupes de IncH ont donc un système de conjugaison thermo-sensible. Les différences de tailles observées entre ces plasmides sont la conséquence de l'insertion d'éléments génétiques mobiles (Mirza et al., 2000). Par exemple, les différences observées entre HCM1 (Parkhill et al., 2001) et R27 sont dues à deux clusters portant des gènes de résistance aux antibiotiques (Wain et al., 2003).

Les méga-plasmides peuvent donc avoir des tailles différentes. Bien que certains soient aussi gros que des chromides, ils gardent des caractéristiques de plasmides. En effet, ils portent une origine de réplication plasmidique et un système de conjugaison. L'ensemble des caractéristiques présentées dans cette introduction rend les méga-plasmides intéressants pour l'étude du système de résolution des dimères de réplicon. A ce jour, aucune donnée concernant les mécanismes de résolution de dimères des méga-plasmides n'est disponible.

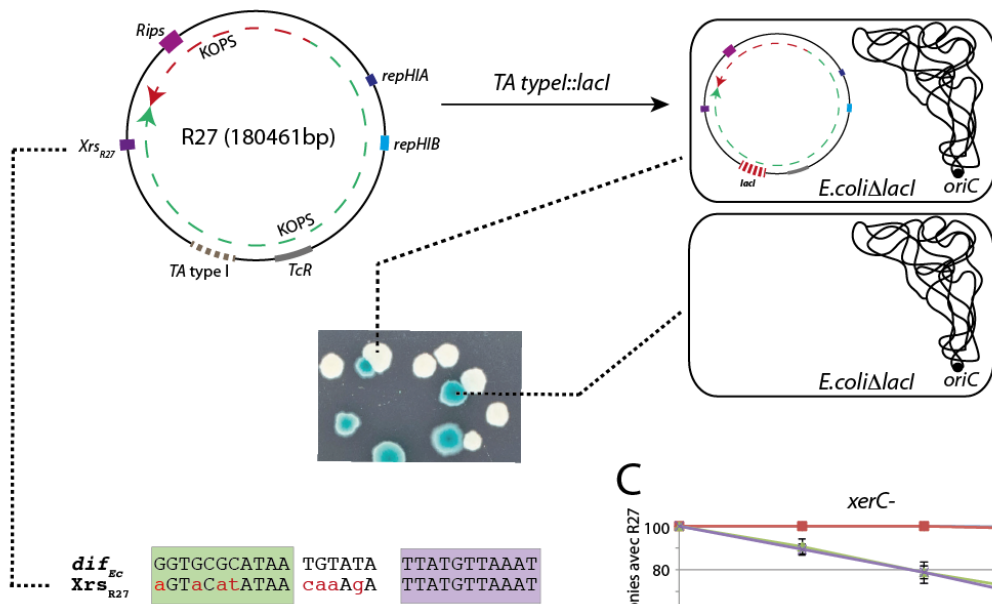
II-Résultats

1. Résumé

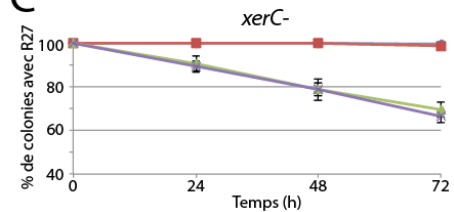
Les résultats présentés dans ce chapitre correspondent à l'initiation d'un projet large portant sur la domestication des plasmides en composants stables du génome: les chromides. Devenir un composant stable du génome implique de s'adapter aux mécanismes cellulaires de l'hôte. Deux mécanismes principaux sont différenciellement contrôlés si on compare les plasmides et les chromosomes. Ces deux mécanismes sont l'initiation de la réplication et la résolution des dimères de réplicon. Le même système de recombinaison spécifique de site, Xer, est différenciellement contrôlé pour résoudre les dimères de plasmide et de chromosome dans la même cellule. Toutefois, à partir d'une certaine taille de réplicon, le système plasmidique de filtre topologique ne fonctionnerait plus. Dans le but d'apporter une vision juste de l'adaptation du système de résolution des dimères de réplicon, je me suis intéressé aux méga-plasmides et aux chromides.

Dans le but d'obtenir des informations sur le contrôle de la résolution des dimères de réplicon de différentes tailles, j'ai étudié un méga-plasmide modèle: R27, et une collection de sites de recombinaison de type Xer (*cf.* Introduction générale). L'ensemble des sites de recombinaison de type Xer choisis provient de méga-plasmides de tailles différentes ainsi que de chromides. Les expériences décrites et interprétées regroupent des approches *in vivo* et *in vitro*. Elles m'ont permis d'apporter de nouvelles données sur la résolution de dimères du méga-plasmide R27. Les dimères du méga-plasmide R27 sont résolus par deux systèmes complémentaires. Un des systèmes est dépendant de la présence d'une recombinase à tyrosine dont le mécanisme d'action n'est pas encore résolu. Le second système est dépendant des recombinases XerCD d'*Escherichia coli* ainsi que de la présence du site Xr_{SR27} . Ce site de recombinaison est homologue à celui du chromosome d'*Escherichia coli*: dif_{Ec} . Le mécanisme de recombinaison entre deux sites Xr_{SR27} semble identique au mécanisme de recombinaison

A



C



B

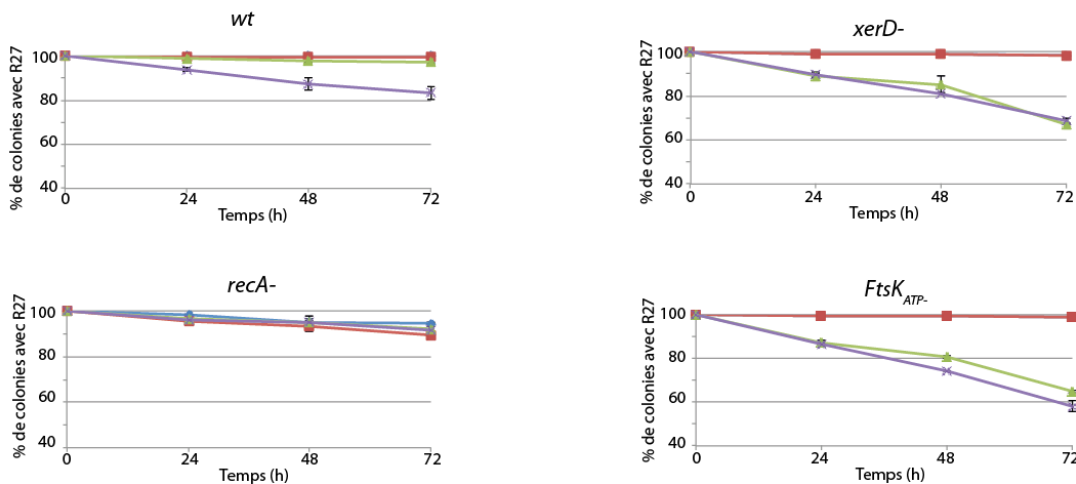


Figure 17 : Les dimères du méga-plasmide R27 sont résolus par deux systèmes complémentaires. **A :** schémas du méga-plasmide R27 et de l'expérience réalisée. Certains gènes sont localisés sur R27. Notamment le gène qui code RIPS, et les gènes responsables de la résistance à la tétracycline. Les séquences de *Xrs_{R27}* et *dif_{Ec}* sont données, les divergences correspondent aux bases en minuscule et rouge. Le plasmide R27 *TAtypel::lacI* est utilisé pour le test (cf. texte associé). La perte du plasmide entraîne la formation de colonies bleues (cf. photo et texte associé). **B et C :** Les graphiques représentent le pourcentage de colonies blanches (avec le plasmide) en fonction du temps. Ce pourcentage correspond au rapport du nombre de colonies blanches sur le nombre total de colonies (blanches et bleues), multiplié par 100. La droite bleue correspond à R27 *TAtypel::lacI*, la droite rouge correspond à R27 *TAtypel::lacI* délété de *Xrs_{R27}*, la droite verte correspond à R27 *TAtypel::lacI* délété de *RIPS* et la droite violette correspond à R27 *TAtypel::lacI* délété de *Xrs_{R27}* et de *RIPS*. Le génotype des souches utilisées pour chaque expérience est indiqué au dessus de chaque graphique. R27 *TAtypel::lacI* est extrêmement stable.

entre deux sites *dif_{Ec}*. XerC_{Ec} et XerD_{Ec} se fixent sur *Xrs_{R27}* et, sur ce complexe formé FtsK s'arrête et active la recombinaison. L'analyse des sites de recombinaison de type Xer de l'ensemble des plasmides d'*E.coli* montre qu'à partir d'une certaine taille (130 Kpb), tous les réplicons portent un site homologue à *dif_{Ec}*. De plus, en sélectionnant une collection représentative des différents sites, j'ai montré que ces sites, homologues à *dif_{Ec}* ont la capacité de résoudre les dimères de chromosome d'*E.coli*. L'ensemble des sites capables de résoudre les dimères de chromosome ont un mécanisme de recombinaison dépendant de l'activation par la protéine FtsK. Pour conclure, les réplicons d'une taille supérieure à environ 130 Kpb ont acquis un système de résolution de dimère de type chromosomique fonctionnel. Les expériences et les résultats obtenus sont décrits et discutés dans les chapitres suivants.

2. Les méga-plasmides ont adopté un système de résolution de dimère chromosomique

a- La stabilité du méga-plasmide R27 est dépendante de deux systèmes de résolution de dimères de réplicon.

Dans le but d'identifier les acteurs de la résolution de dimères de méga-plasmide, j'ai étudié les effets sur R27 de la délétion des différents systèmes hypothétiquement impliqués dans la résolution de ses dimères. Pour cela, j'ai utilisé un plasmide R27 délété du gène codant pour les composants d'un système toxine-antitoxine de type I, remplacé par le gène *lacI* (R27 *TAtypel::lacI*). Ce plasmide possède un site homologue au site *dif* du chromosome de *E.coli*, nommé *Xrs_{R27}* (Xer recognition site of R27). Il possède aussi une recombinase à tyrosine (Figure 17 A) dont la partie C-terminale est homologue à Cre (*cf.* Introduction générale), sa région N-terminale, quant à elle, semble homologue au domaine régulateur de l'intégrase du bactériophage λ .

Cette étude a été faite dans des souches d'*E.coli* délétées du gène *lacI* (Figure 17 A). Dans une souche sauvage et à partir d'un plasmide R27 Δ TA::*lacI*, la délétion du site *Xrs_{R27}* ou de la recombinaise seule, n'entraîne pas une perte du plasmide. Lorsque les deux (*Xrs_{R27}* et la recombinaise) sont délétés, on observe une augmentation du nombre de cellules ayant perdu le plasmide : au bout de 72 heures, approximativement 20% des cellules n'ont plus le plasmide (Figure 17 B). *Xrs_{R27}* et la recombinaise sont donc impliqués dans la stabilité du plasmide. Comme la double délétion montre un phénotype de perte de plasmide, les rôles de *Xrs_{R27}* et de la recombinaise semblent complémentaires. De plus, la délétion d'un des deux composants étudiés semble être complétée par la présence de l'autre. La recombinaise portée par R27 est donc impliquée dans sa stabilité. Elle a été nommée RIPS pour "Recombinase involved in plasmid stability". Dans le but de vérifier si l'instabilité de R27 *TATypeI*::*lacI* Δ RIPS Δ *Xrs_{R27}* est la conséquence de problèmes de dimérisation, un test identique a été réalisé dans une souche *recA*-. RecA est une protéine impliquée dans la recombinaison homologue, qui lorsqu'elle produit un nombre impair de crossing-over entraîne la formation de molécules dimériques. Dans cette souche le pourcentage de cellules ayant perdu le plasmide est identique quelque soient les mutations présentes sur R27. La mutation *recA*- est donc épistatique sur la double délétion Δ RIPS Δ *Xrs_{R27}* (Figure 17 B). L'ensemble de ces résultats suggère que le site *Xrs_{R27}*, ainsi que la recombinaise RIPS, sont impliqués dans la résolution des dimères du plasmide R27.

Le système Xer chromosomique, chez *E.coli*, est dépendant de XerCD et de FtsK pour son activation, nous avons donc testé l'implication de ces trois acteurs sur la stabilité de R27. Les souches délétées de *xerC* (*xerC*-), de *xerD* (*xerD*-) ou mutées pour FtsK (*ftsK_{ATP}*-) ont été conjuguées par les mutants de R27. Aucune de ces trois mutations n'a d'effet sur un plasmide R27 délété de *Xrs_{R27}*, qui reste stable (Figure 17 C). Le plasmide délété pour RIPS et le plasmide double mutant montrent une instabilité similaire dans ces trois souches mutantes : au bout de 72h, 50%, ou plus, des bactéries ont perdu le plasmide (Figure 17 C). Ces deux observations suggèrent que l'activité des protéines XerC, XerD et FtsK est dépendante de la présence de *Xrs_{R27}* sur le plasmide. Toutefois, dans une souche *ftsK_{ATP}*-, le mutant R27 *TATypeI*::*lacI* Δ RIPS Δ *Xrs_{R27}* semble plus instable (Figure 17 C), ce qui pourrait être la conséquence d'un défaut de ségrégation du réplicon. En effet, nous pouvons trouver sur R27 un ensemble de séquences répétées orientées vers *Xrs_{R27}*, homologues aux KOPS. La présence de séquences KOPS orientées

des origines de réplication vers *Xr_{SR27}* suggère que FtsK interviendrait dans la ségrégation de ce réplicon (Stouf et al., 2013).

L'ensemble de ces résultats montre que deux systèmes sont impliqués dans la résolution des dimères du plasmide R27. Le premier semble similaire au système de résolution de dimères chromosomiques. Il est dépendant de la présence d'un site de recombinaison (*Xr_{SR27}*) homologue au site *dif_{Ec}*, ainsi que des recombinases XerC, XerD et de la translocase à ADN FtsK dont les gènes sont portés par le chromosome bactérien. Le second est dépendant de la recombinase RIPS dont les caractéristiques restent à déterminer.

b- Mécanistique du système XerCD/Xr_{SR27}/FtsK.

Si *Xr_{SR27}* recombine avec les mêmes caractéristiques qu'un site *dif* chromosomique, il doit être capable de résoudre les dimères de chromosomes de manière dépendante de FtsK. Des expériences de co-cultures ont été réalisées chez *Escherichia coli*. Nous pouvons voir qu'une souche $\Delta dif::Xr_{SR27}$ présente un défaut de viabilité plus faible qu'une souche Δdif face à une souche sauvage. Le défaut de viabilité correspond à la perte de compétitivité ou fitness d'une souche par rapport à une autre. L'ensemble de ces différences sont effacées lorsque la même expérience est faite avec des souches *recA*- (Figure 18 A). Un site *Xr_{SR27}* semble donc être capable de résoudre les dimères de chromosomes chez *E.coli*.

D'un point de vue mécanistique, cette activité de résolution de dimères est dépendante d'événements de recombinaison au site *Xr_{SR27}*. Pour cela, XerCD_{Ec} doivent se fixer sur *Xr_{SR27}*, entraîner la formation de la synapse et stopper la translocation de FtsK. L'arrêt de translocation est indispensable pour que la réaction de recombinaison soit activée (Fournes et al., 2016). Le site *Xr_{SR27}* est composé d'un bras de fixation pour XerD identique à celui de *dif_{Ec}* et d'un bras XerC divergent au niveau de quatre paires de bases (Figure 18 B). La région centrale des deux sites est différente, ce qui empêche la fusion

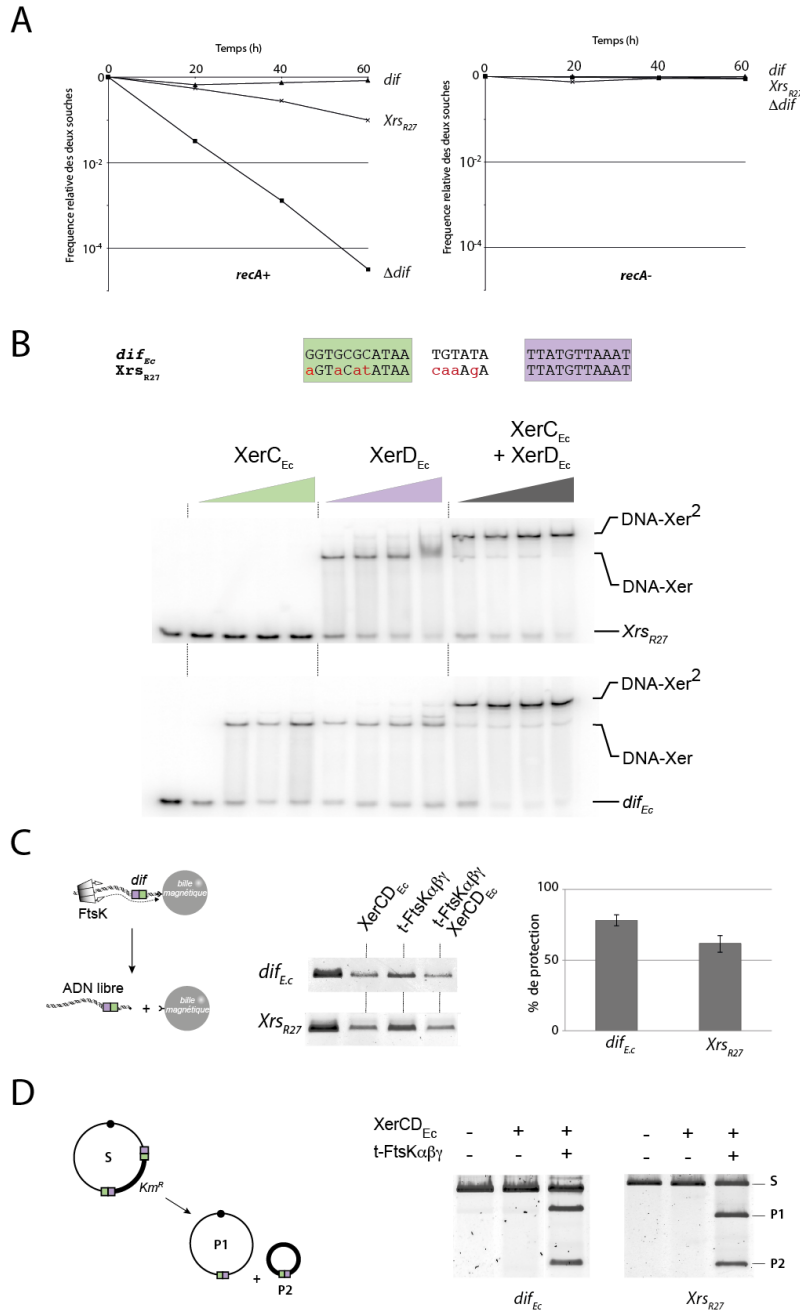


Figure 18 : Caractéristiques du système Xer de R27. **A** : Le site Xrs_{R27} est capable de résoudre les dimères de chromosomes. Les souches sauvages, Δdif et $\Delta dif::Xrs_{R27}$ sont mises en compétition contre la souche sauvage. Les expériences de co-cultures ont été réalisées dans des conditions $recA^+$ ou $recA^-$. Le rapport du nombre de bactéries entre de la souche testée et la souche sauvage est appelé fréquence relative des deux souches. Cette fréquence représentée en fonction du temps correspond au défaut de viabilité de la souche étudiée. **B** : $XerC_{Ec}$ et $XerD_{Ec}$ se fixent sur Xrs_{R27} . Les expériences de gel retard montrent l'interaction d'un concentration croissante en XerC et XerD et un fragment d'ADN de 28 pb contenant soit dif_{Ec} soit Xrs_{R27} . L'ADN seul, un complexe avec une recombinase fixée (DNA-Xer) et un complexe avec deux recombinases fixées (DNA-Xer²) sont représentés. Les concentrations de $XerC_{Ec}$ et $XerD_{Ec}$ vont de 0,2 μM à 0,8 μM **C** : La translocation de t-FtsK $\alpha\beta\gamma$ est stoppée par un complexe $XerCD_{Ec}/Xrs_{R27}$. Le test de translocation est schématisé à gauche, au centre, chaque gel correspond à l'analyse de l'ADN libre contenant soit dif_{Ec} soit Xrs_{R27} après incubation avec les protéines indiquées au dessus. L'arrêt de translocation est quantifié (à droite) (Cf. Fournes et al. 2016). **D** : Le site Xrs_{R27} recombine dépendamment de $XerCD_{Ec}$ et t-FtsK $\alpha\beta\gamma$. La réaction est schématisée à droite et les résultats sont présentés à gauche. Le substrat et les produits de recombinaison P1 et P2 sont séparés par électrophorèse. **C et D** : Les concentrations en $XerC_{Ec}$ et $XerD_{Ec}$ sont de 0,3 μM et la concentration en t-FtsK $\alpha\beta\gamma$ est de 0,5 μM

des deux réplicons comme c'est le cas pour les chromosomes de *V.cholerae*. Une concentration croissante en XerC_{E.c} incubée avec un ADN contenant *Xrs_{R27}* ne permet pas la formation de complexe en gel retard. Au contraire, une concentration croissante en XerC_{E.c} incubée avec un ADN contenant *dif_{E.c}* forme le complexe DNA-Xer (Figure 18 B). Ce complexe correspond à la fixation de XerC_{E.c} sur son bras (Blakely et al., 1993). Les divergences du bras XerC entre *Xrs_{R27}* et *dif_{E.c}* empêchent donc la fixation de XerC seule. Ces deux sites ne présentent aucune différence de comportement lorsqu'ils sont incubés avec une concentration croissante en XerD_{E.c} (Figure 18 B). Lorsque XerC_{E.c} et XerD_{E.c} sont incubées en même temps, que ce soit avec un ADN contenant *Xrs_{R27}* ou un ADN contenant *dif_{E.c}*, un complexe (DNA-Xer²) se forme (Figure 18 B). D'après les résultats publiés, ce complexe correspond à la fixation de XerC_{E.c} et XerD_{E.c} sur leur bras respectif (Blakely et al., 1993). Les différences en nucléotide de *Xrs_{R27}* n'empêchent donc pas la formation de complexes *Xrs_{R27}/XerCD_{E.c}* qui sont indispensables à la réaction de recombinaison.

Une fois ces complexes formés, ils doivent être activés par FtsK. Pour cela, FtsK doit s'arrêter sur un complexe *Xrs_{R27}/XerCD_{E.c}* et non le détruire. J'ai donc testé l'arrêt de translocation de FtsK sur ce complexe en le comparant à l'arrêt de FtsK sur un complexe *dif_{E.c}/XerCD_{E.c}*. Pour cela j'ai utilisé une technique basée sur la capacité de FtsK à détruire les interactions Streptavidine/Biotine (Fournes et al., 2016). Pour cette expérience, j'ai utilisé la forme trimérique du domaine C-terminal de FtsK_{E.c} (t-FtsK $\alpha\beta\gamma$) dont l'activité de translocation est connue (Croizat et al., 2010). Lorsque t-FtsK $\alpha\beta\gamma$ est ajoutée à la réaction contenant un ADN qui porte *dif_{E.c}* la quantité d'ADN relachée dans le surnageant augmente. En incubant XerCD_{E.c} et t-FtsK $\alpha\beta\gamma$ en même temps, cette même quantité d'ADN relachée diminue, ce qui montre que t-FtsK $\alpha\beta\gamma$ s'arrête sur un complexe XerCD_{E.c}/*dif_{E.c}* (Figure 18 C). Un résultat similaire est obtenu avec un ADN contenant *Xrs_{R27}* (Figure 18 C). La quantification de l'arrêt de translocation montre une différence faible entre les résultats obtenus avec un ADN contenant *Xrs_{R27}* ou un ADN contenant *dif_{E.c}* (Figure 18 C). Cette différence pourrait être la cause du léger défaut de viabilité d'une souche $\Delta dif::Xrs_{R27}$ face à une souche sauvage obtenu en co-culture (Figure 18A). L'arrêt de translocation de FtsK est associé à l'activation de la recombinaison, visualisable *in vitro* par délétion de cassette flanquée par deux sites en répétition directe. Nous avons donc construit deux cassettes: *dif_{E.c}-dif_{E.c}* et *Xrs_{R27}-Xrs_{R27}* et la

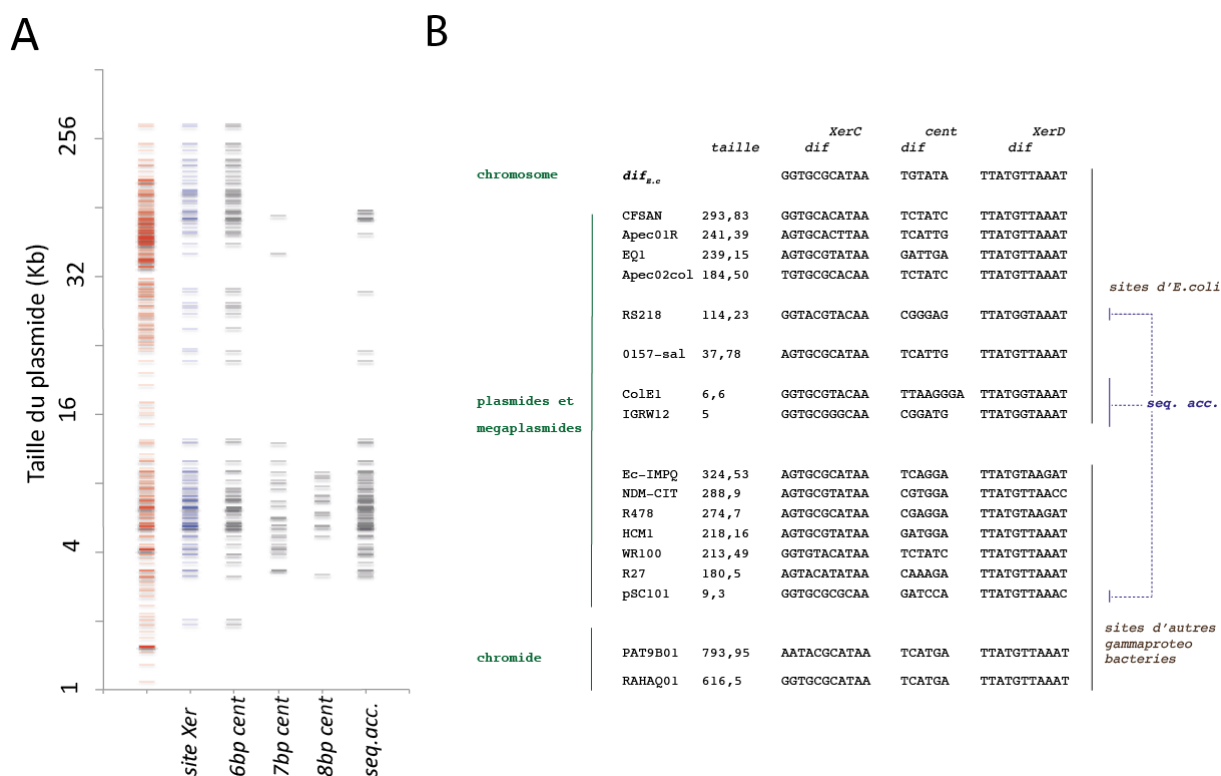


Figure 19 : Les sites *Xrs* des méga-plasmides. **A** : répartition des sites *Xrs* chez les plasmides d'*Escherichia coli*. En rouge, les plasmides retrouvés chez *E.coli* sont classés en fonction de leur taille. En bleu est représentée la répartition des plasmides qui portent un site *Xrs* en fonction de leur taille. Ces sites *Xrs* sont classés en fonction de la longueur de leurs régions centrales (6, 7 ou 8 pb). Les séquences accessoires retrouvées, en association avec les sites à 6, 7 ou 8 pb centrales, sont aussi représentées en fonction de la taille des plasmides sur lesquels elles sont trouvées. **B** : Séquences des sites *Xrs* sélectionnés. Les noms des plasmides, méga-plasmides ou chromides d'où proviennent les sites *Xrs* sont notés. L'origine (*E.coli* ou autres gamma-proteobactéries) ainsi que la taille des réplicons sont indiquées. La présence de séquences accessoires est aussi notée.

réaction de recombinaison complète entraîne la formation de deux produits P1 et P2. Pour une cassette $dif_{E.c}-dif_{E.c}$, ces produits sont présents seulement lorsque la réaction contient XerCD_{E.c} et t-FtsK $\alpha\beta\gamma$, et c'est aussi le cas pour la cassette $Xrs_{R27}-Xrs_{R27}$ (Figure 18 D). La réaction de recombinaison entre deux sites Xrs_{R27} nécessite donc XerC_{Ec} et XerD_{Ec} ainsi que FtsK_{Ec} pour l'activation de la réaction de recombinaison.

L'ensemble de ces résultats montre que Xrs_{R27} fonctionne comme un site *dif* chromosomique d'un point de vue mécanistique. L'interaction de Xrs_{R27} avec les recombinases XerC_{Ec} et XerD_{Ec} forme un complexe sur lequel FtsK s'arrête spécifiquement. L'activation de la recombinaison est dépendante de la protéine FtsK.

c- A partir de 130 Kpb tous les méga-plasmides portent un site Xrs similaire au site dif chromosomique

Le système de résolution des dimères du plasmide modèle R27 est un système chromosomique. Le but de cette étude est de démontrer que les systèmes de résolution de dimères chromosomiques et plasmidiques sont dépendants de la taille des réplicons. Pour cela, l'étude d'un ensemble de plasmides et méga-plasmides de tailles différentes reste indispensable.

J'ai étudié la répartition des sites de recombinaison Xer des plasmides que l'on retrouve dans différentes souches d'*E.coli* (Figure 19 A). Sur 417 plasmides de tailles différentes, allant presque jusqu'à 300kpb (CFSAN: 293,83Kpb), 35% possèdent un site *Xrs*. Les sites *Xrs* ont été identifiés par homologie avec le bras de fixation pour XerD de $dif_{E.c}$. Cette partie du site de recombinaison est extrêmement conservée chez les protéobactéries (Carnoy and Roten, 2009). Les sites identifiés ont des caractéristiques différentes. Notamment, la longueur de leur région centrale qui peut faire 6, 7 ou 8 pb (Figure 19 A). Les régions centrales composées de 8 pb sont toujours retrouvées chez les plus petits plasmides. Il en est de même pour les sites ayant une région centrale de 7pb. Deux méga-plasmides de taille inférieure à 130 Kpb font exception et portent un site à 7

pb de bases centrales. L'ensemble des sites à 8 pb centrales est associé à des séquences accessoires (Figure 19 A). La présence de séquences accessoires semble indiquer que leurs mécanismes de résolution de dimères sont dépendants d'un filtre topologique (cf. Introduction Partie C). Les sites avec une région centrale de 7pb sont aussi associés à des séquences accessoires (Figure 19 A). Les sites *Xrs* à 6pb sont retrouvés sur des plasmides de différentes tailles, allant des plus petits aux plus grands. Ils sont associés ou non à des séquences accessoires. Il est important de souligner qu'à partir d'une taille, supérieure à 130 Kpb, un seul type de site *Xrs* est retrouvé. Il correspond à des sites à 6 pb, non associés à des séquences accessoires (Figure 19 A).

L'ensemble de ces observations semble indiquer une certaine dynamique d'évolution des sites *Xrs* en fonction de la taille des plasmides. En fonction d'une taille croissante des réplicons, cette dynamique tend vers des sites à 6pb non associés à des séquences accessoires. Ces sites pourraient alors se comporter comme des sites *dif* chromosomiques, et permettre un système de résolution de dimères dépendant de FtsK.

Dans le but de caractériser le système de résolution de dimères d'un large éventail de méga-plasmides, j'ai sélectionné un certain nombre de sites *Xrs*. Ces sites *Xrs* sont portés par des réplicons de différentes tailles (de 5 Kpb à 293,83 Kpb). Ces réplicons sont retrouvés dans différentes souches d'*E.coli* (étude présentée en Figure 19 A), ou dans d'autres souches de γ -proteobactéries (Figure 19 B). Deux sites *Xrs* de chromosomes secondaires de *Pantoea* sp. At-9b (*XrSPAT9B01*) et *Rahnella* sp. Y960 2 (*XrSRAHAQ0*) ont aussi été sélectionnés. Ils devraient avoir un mécanisme identique à celui de *dif_{E.c}* et *XrSR27*. Les sites *XrSPAT9B01* et *XrSRAHAQ01* vont correspondre aux témoins positifs de résolution des dimères de chromosome dans l'étude présentée dans le chapitre suivant. Les sites *cer* de ColE1 (8 pb centrales) et *psi* de pSC101 (6 pb centrales) sont des sites plasmidiques. Ils sont associés à des séquences accessoires et leurs mécanismes de résolution de dimères sont décrits (pour revue: Crozat et al., 2014a, ANNEXE 1). Leurs mécanismes sont dépendants d'un filtre topologique. Le site *cer* ne résout pas les dimères de chromosomes alors que *psi* en a légèrement la capacité (Capiaux et al., 2002). Ces deux sites plasmidiques vont correspondre aux témoins négatifs de résolution des dimères de chromosome.

d- Les sites Xrs des méga-plasmides se comportent comme un site dif chromosomique

La première caractéristique à tester pour l'ensemble de ces sites est leur capacité à résoudre les dimères de chromosome. Pour cela, l'ensemble des sites coeur sélectionnés sont insérés sur le chromosome d'*E.coli* à la place de *dif_{Ec}*. Les souches résultantes sont alors utilisées dans des expériences de co-cultures où chacune d'elle est mise en compétition avec une souche sauvage, contenant *dif_{Ec}*. Tous les défauts de viabilité observés dans l'expérience présentée en figure 20 A et B sont abolis dans des souches *recA*⁻ (données non présentées) (Cf. Partie C II-b). Ces défauts sont donc dépendants de la résolution des dimères de chromosome.

Premièrement j'ai testé les sites des chromosomes secondaires ainsi que les sites des plus petits plasmides associés à des séquences accessoires, en prenant comme contrôle *cer* et *psi* (Figure 20 A). Le site *psi* montre tout de même un défaut de viabilité qui indique qu'il n'a pas la capacité de résoudre tous les dimères de chromosome. Lorsque le site *dif_{Ec}* est remplacé par les sites des deux chromosomes secondaires *XrSPAT9B01* et *XrSRAHAQ01*, le défaut de viabilité des deux souches testées est inférieur à celui observé pour *psi* (Figure 20 A). Ces deux sites sont donc capables de résoudre les dimères de chromosome. Les sites issus des plasmides RS218 (*XrSR218*) et IGRW12 (*XrSIGRW12*) sont, tous deux, des sites à 6pb centrales, et ils sont associés à des séquences accessoires (Figure 19 B). Le plasmide RS218 a une taille de 114 Kpb alors que IGRW12 a une taille de 5 Kpb. Une souche contenant le site *XrSR218* à la place de *dif_{Ec}* montre aussi un défaut de viabilité plus faible qu'une souche contenant *psi* (Figure 20 A). Tout comme les sites de chromosomes secondaires, *XrSR218* semble pouvoir résoudre les dimères de chromosome. En revanche, le défaut de viabilité d'une souche contenant le site *XrSIGRW12* est proche d'une souche délétée du site *dif*, tout comme une souche contenant *cer* (Figure 20 A). Ce résultat indique que *XrSIGRW12* n'est pas capable de résoudre les dimères de chromosome.

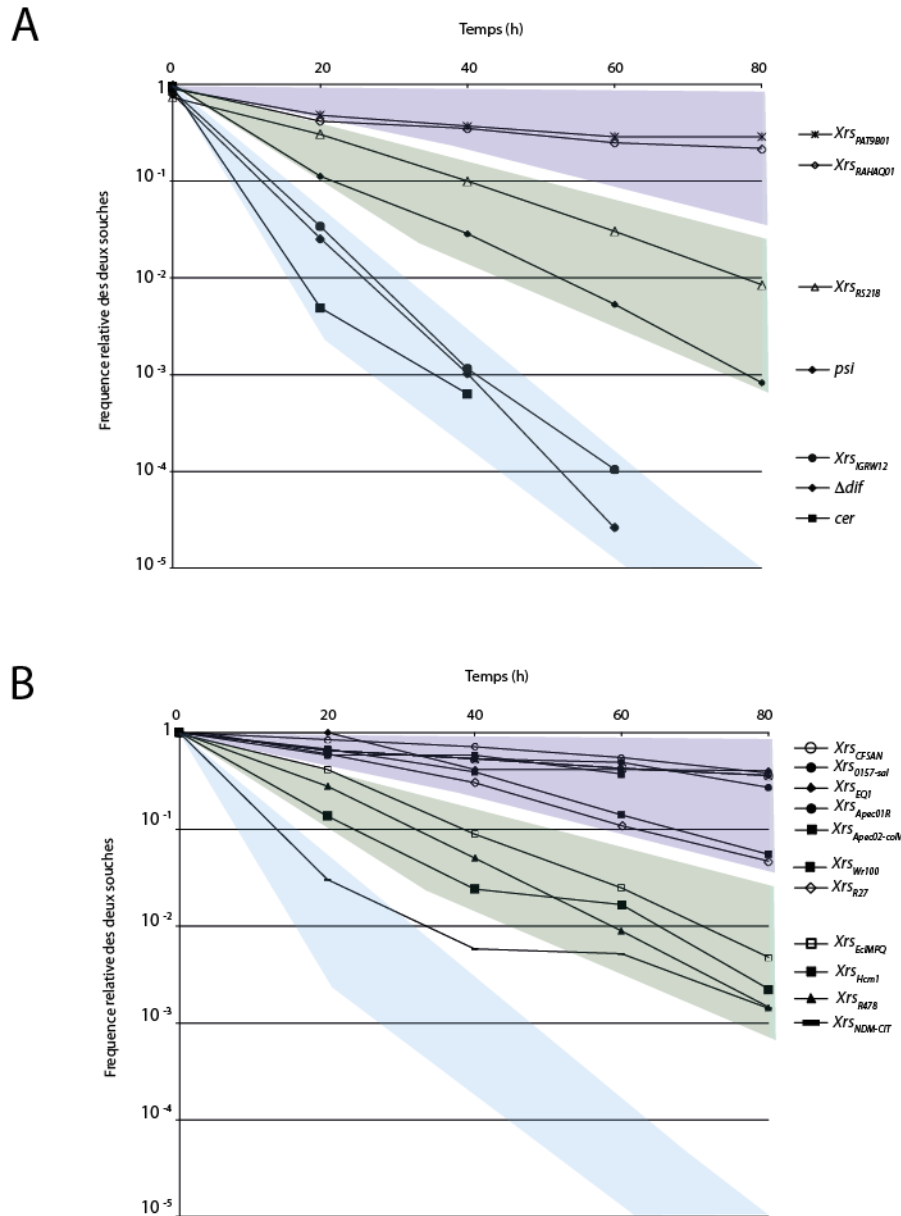


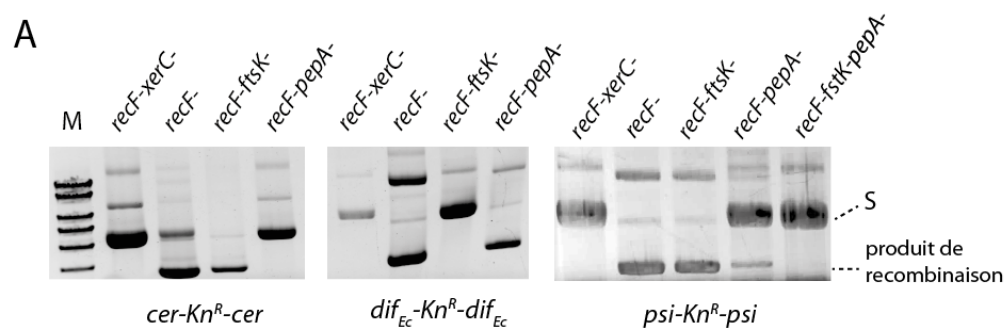
Figure 20 : Résolution des dimères de chromosomes par les sites *Xrs* sélectionnés. La correspondance des motifs avec les sites *Xrs* est rapportée à droite des graphiques **A** : Les souches Δdif ou contenant les sites *Xrs*, *cer* et *psi* sont mises en compétition contre une souche sauvage. La fréquence relative des deux souches en compétition est représentée en fonction du temps (défaut de viabilité de la souche mutante contenant *Xrs*). L'étude d'un nombre limité de sites comme *cer*, *psi*, ou les sites *Xrs* de chromosomes secondaires, dont le fonctionnement vis à vis de dimères de chromosome semble établi permet de définir deux classes de sites *Xrs* : les sites *Xrs* capables de résoudre les dimères de chromosomes (violet et vert) et les sites *Xrs* incapables de résoudre les dimères de chromosomes (bleu). **B** : La même expérience est réalisée sur l'ensemble des autres sites *Xrs* à 6 pb centrales, les résultats sont représentés dans ce graphique.

Cette première étude sur cinq sites *Xrs* permet de former deux groupes. Le premier, coloré en violet et vert, correspond aux sites *Xrs* capables de résoudre les dimères de chromosomes. Les sites *Xrs* associés à ce groupe auront un défaut de viabilité inférieur à la souche contenant *psi*. Le second, coloré en bleu, correspond aux sites *Xrs* incapables de résoudre les dimères de chromosome. Les sites *Xrs* associés à ce groupe auront un défaut de viabilité similaire à une souche délétée du site *dif* ou contenant *cer*.

L'ensemble des autres sites *Xrs* testés ont un défaut de viabilité inférieur à une souche contenant *psi* (Figure 20 B). Ils sont donc capables de résoudre les dimères de chromosome. Ces sites *Xrs* sont issus de plasmides allant de 37,78 Kpb à 293,83 Kpb. Ils ont tous une région centrale de 6 pb et ne sont pas associés à des séquences accessoires. Nous pouvons donc conclure que tous les sites ayant une région centrale de 6 pb et qui ne sont pas associés à des séquences accessoires sont capables de résoudre les dimères de chromosome. De plus, il semblerait que certains sites à 6 pb centrales, associés à des séquences accessoires sont capables de résoudre les dimères de chromosome. De plus, tous les sites qui résolvent les dimères de chromosome devraient recombiner de manière dépendante de XerC/XerD et de FtsK.

e- Les sites qui résolvent les dimères de chromosome recombinent de manière dépendante de FtsK.

Pour vérifier cette hypothèse, j'ai construit une cassette *Xrs-Kn^R-Xrs* pour chaque site étudié. Chaque cassette a été testée en recombinaison *in vivo* pour identifier les acteurs de recombinaison chromosomique et/ou plasmidique indispensables à leur délétion (Figure 21). Le site coeur des *Xrs* ainsi que les 300 pb adjacentes au bras de fixation pour XerC ont été utilisés dans cette expérience. Ces 300 pb supplémentaires ont été sélectionnées dans le but de prendre en compte des séquences accessoires potentielles. Les sites *dif_{Ec}*, *cer* et *psi* sont utilisés comme contrôle (Figure 21 A). La délétion des cassettes flanquées par ces trois sites n'est pas observée dans une souche



B

strain <i>Xrs</i>	<i>recF-xerC-</i>	<i>recF-</i>	<i>recF-ftsK-</i>	<i>recF-pepA-</i>	<i>recF-ftsK-pepA-</i>
<i>dif_{Ec}</i>	-	+	-	+	<i>nd</i>
<i>cer</i>	-	+	+	-	<i>nd</i>
<i>psi</i>	-	+	+	+/-	-
<i>Xrs</i> _{RAHAQ01}	-	+	-	+	<i>nd</i>
<i>Xrs</i> _{PAT9B01}	-	+	-	+	<i>nd</i>
<i>Xrs</i> _{EC-IMPQ}	-	+	-	+	<i>nd</i>
<i>Xrs</i> _{CFSAN}	-	+	-	+	<i>nd</i>
<i>Xrs</i> _{NDM-CIT}	-	+	-	+	<i>nd</i>
<i>Xrs</i> _{R478}	-	+	-	+	<i>nd</i>
<i>Xrs</i> _{Apec01R}	-	+	-	+	<i>nd</i>
<i>Xrs</i> _{EQ1}	-	+	-	+	<i>nd</i>
<i>Xrs</i> _{HCM1}	-	+	-	+	<i>nd</i>
<i>Xrs</i> _{WR100}	-	+	-	+	<i>nd</i>
<i>Xrs</i> _{Apec02colv}	-	+	-	+	<i>nd</i>
<i>Xrs</i> _{0157-sal}	-	+	-	+	<i>nd</i>
<i>Xrs</i> _{IGRW12}	-	+	+	-	<i>nd</i>
<i>Xrs</i> _{RS218}	-	+	+	+/-	-

Figure 21 : Tous les sites qui résolvent les dimères de chromosome recombinant dépendamment de FtsK. **A** : Recombinaison *in vivo* des cassettes témoins *dif_{Ec}-kn^R-dif_{Ec}*, *cer-kn^R-cer* et *psi-Kn^R-psi*. A partir d'un plasmide contenant la cassette (S), l'activation de la recombinaison entraîne la délétion de la cassette se trouvant entre les deux sites de recombinaison en répétition directe (produit de recombinaison). La souche dans laquelle le test de recombinaison est fait, est indiquée au dessus de la piste du gel. **B** : Tableau montrant l'activité de délétion de cassette, en fonction des sites *Xrs* étudiés et des souches utilisées. + signifie que la délétion de cassette est observée, +/- signifie que la délétion de cassette est réduite et - signifie que l'on observe pas de délétion de cassette (*nd* = non déterminée). Cette iconographie est basée sur les résultats obtenus par l'étude des cassettes témoins.

xerC-. Alors que nous pouvons observer que la délétion de la cassette flanquée par deux sites *cer* est dépendante de PepA_{Ec} , celle flanquée par deux sites dif_{Ec} est dépendante de FtsK_{Ec} (Figure 21 A). Étonnament, pour le site *psi* nous pouvons observer que la délétion de la cassette est principalement réduite dans une souche *pepA*-, mais une faible proportion de cassette excisée reste visible. Cette faible proportion de délétion de cassette n'est plus observée dans une souche double mutante *ftsK-pepA*- (Figure 19 A). PepA et FtsK ont donc une activité synergique sur l'activation de la recombinaison entre deux sites *psi*. La recombinaison au site *psi* montre donc une double activabilité: elle est principalement activée *via* un filtre topologique mais elle a aussi la capacité d'être activée par FtsK_{Ec} . Cette observation pourrait expliquer la capacité du site coeur de *psi* à pouvoir résoudre les dimères de chromosome.

En ce qui concerne les sites *Xrs* testés, leur recombinaison est dépendante de la présence de XerC_{Ec} (Figure 21 B). La délétion de cassette construite à partir des sites capables de résoudre les dimères de chromosomes est dépendante de FtsK_{Ec} (Figure 21 B). Les deux sites sélectionnés associés à des séquences accessoires ont des comportements différents: la recombinaison entre deux sites *XrS_{IGRW12}* est seulement dépendante de PepA_{Ec} , et la recombinaison entre deux sites *XrS_{RS218}* est majoritairement dépendante de PepA_{Ec} mais semble aussi activable par FtsK_{Ec} (Figure 21 B).

Ces résultats indiquent que l'ensemble des sites à 6 pb centrales présents sur les méga-plasmides fonctionnent comme un site *dif* chromosomique, ils sont dépendants de XerCD_{Ec} et de FtsK_{Ec} . Les sites à 6 pb centrales associés à des séquences accessoires montrent un comportement différent. Le site de *IGRW12* se comporte comme le site *cer* de résolution de dimères de plasmides et semble dépendant de la formation d'un filtre topologique. Le site de *RS218* se comporte comme le site *psi* et, semble pouvoir fonctionner comme un site de résolution de dimères plasmidiques et comme un site chromosomique. Pour conclure, la recombinaison catalysée aux sites *Xrs* capables de résoudre les dimères de chromosome est dépendante de XerC , XerD et nécessite l'activation de FtsK .

III-Discussion

1. Le méga-plasmide R27 comme modèle d'étude.

Le méga-plasmide R27 est un réplicon d'environ 180 kpb du groupe d'incompatibilité IncHI1 (Sherburne et al., 2000). Il a été le modèle de l'étude du système de recombinaison spécifique de site résolvant les dimères de méga-plasmide. Cette étude a permis de montrer que le système Xer de R27 est dépendant de la présence du site *Xr_SR27* et des recombinases XerC et XerD de son hôte (*Escherichia coli*). L'activation de la réaction de recombinaison est dépendante de la protéine FtsK. Le système Xer de R27 fonctionne donc de manière identique à celui de résolution des dimères de chromosomes de *E.coli*. R27 est un élément génétique mobile capable de conjugaison (Forns et al., 2005) qui porte un système de résolution de dimères dépendant de FtsK. FtsK est une protéine multifonctionnelle qui couple la ségrégation des chromosomes à la division cellulaire. Les caractéristiques du système Xer de R27 nous font entendre que lors de son passage dans une cellule bactérienne il est couplé au cycle cellulaire de son hôte. Cette hypothèse est renforcée par le fait que R27 présente un biais de KOPS. Ce biais est orienté de ses origines de réplication vers *Xr_SR27*. Les séquences KOPS présentes sur R27 sont identiques à celles retrouvées sur le chromosome d'*E.coli*: GGGNAGGG (Ptacin et al., 2006) (Bigot et al., 2005). Ce biais de KOPS pourrait permettre à FtsK de ségréger R27, comme elle le fait avec le chromosome qu'il soit en état monomérique ou dimérique (Stouf et al., 2013).

Cette étude a révélé que, outre la résolution de dimères dépendante de *Xr_SR27*/XerCD/FtsK, un autre système dépendant d'une recombinase à tyrosine, RIPS, était impliqué. R27 a donc deux systèmes de résolution de dimères de réplicon. Toutefois, dans le sub-groupe d'incompatibilité IncHI1, R27 se trouve être le plus petit. En effet, certains plasmides du groupe IncH ont une taille supérieure à 300 Kpb (de Toro et al., 2014). J'ai montré que les sites de recombinaison *Xrs* des méga-plasmides étudiés, dont certains font partie du groupe IncH, permettent la résolution des dimères de

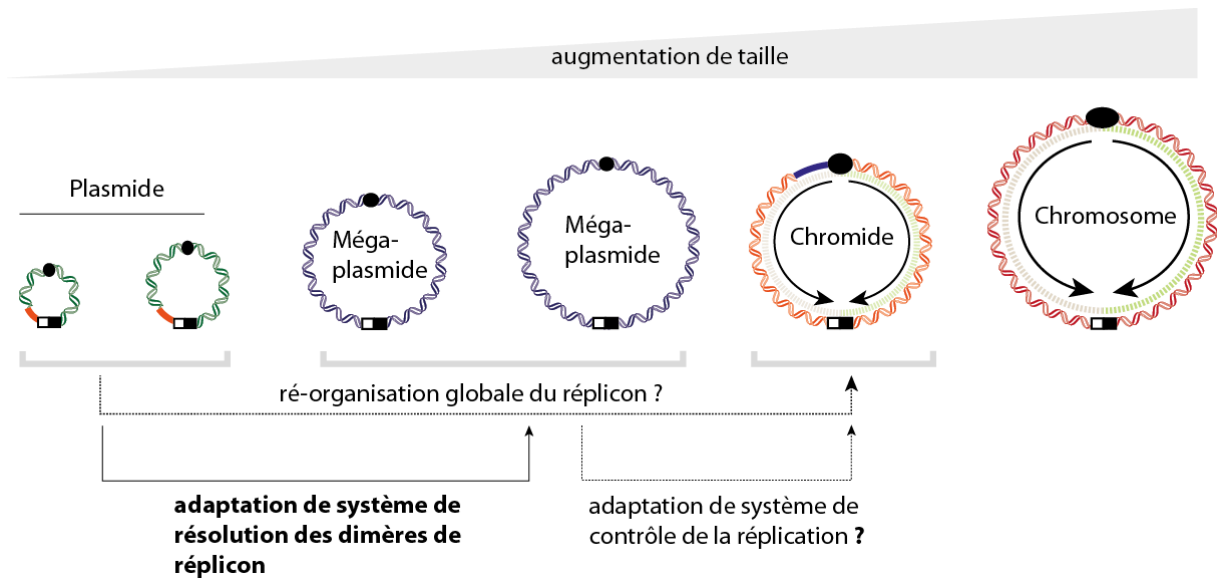


Figure 22 : Schématisation de l'évolution en taille des réplicons et de leurs adaptations. Les réplicons sont de couleurs différentes en fonction de leur taille. Les plasmides sont en vert, les méga-plasmides en bleu, les chromides en orange et les chromosomes en rouge. Pour tous ces réplicons, les origines de réplication sont représentées par des ronds ou ovales noirs, les sites de résolution des dimères sont représentés par deux carrés (noirs et blancs). Pour les plasmides, les séquences accessoires de leurs systèmes de résolution de dimères sont représentées par un trait plein rouge. Pour les chromides, la région régulatrice de l'initiation de réplication est représentée par un trait plein bleu. Pour les chromosomes et chromides, les flèches noires orientées des origines de réplication vers les sites de recombinaison représentent les biais de KOPS, les traits épais de couleur marron et verte représentent les deux réplichores. L'augmentation en taille des réplicons devrait s'accompagner d'une réorganisation globale du réplicon. Les deux mécanismes différenciellement contrôlés entre chromosomes et plasmides sont notés : système de résolution de dimères et contrôle de la réplication. Le système qui s'est adapté lors du passage de plasmides à méga-plasmides est noté en gras, l'adaptation du second système n'a pour le moment pas été montrée expérimentalement.

chromosome. La recombinaise RIPS identifiée est retrouvée chez tous les plasmides du groupe IncH. Le but de ce projet est de montrer que plus le réplicon a une grande taille, plus son système de résolution de dimères est dépendant d'un mécanisme de type chromosomique (Figure 22). Nous pouvons donc nous demander si la complémentarité des deux systèmes observée pour R27 est conservée chez les réplicons du groupe IncH de plus grande taille. L'hypothèse serait que plus le réplicon est grand, plus la résolution de ses dimères serait dépendante du système *Xrs/XerCD/FtsK*. L'instabilité d'un méga-plasmide de taille supérieure à R27 ne serait donc plus dépendante de RIPS. Pour tester cette hypothèse, il serait premièrement possible d'utiliser un méga-plasmide plus grand comme pECIMPQ (Johnson et al., 2006). Bien que ce plasmide fasse partie de la famille IncHI2, il partage le même génome coeur que les plasmides de la famille IncHI1 (Gilmour et al., 2004) (Johnson et al., 2006). Il possède un site *Xrs* de recombinaison dépendant de FtsK (Figure 20 et 21) mais aussi, un gène qui code une protéine homologue à RIPS. Cette protéine homologue est à 70% identique à RIPS. Ce plasmide de plus de 300 kpb nous permettrait de savoir si la résolution de dimères de méga-plasmides plus grand est toujours dépendante des deux systèmes. Une autre possibilité pour étudier un réplicon plus grand serait de faire grossir R27. Pour cela différentes techniques sont à notre disposition dont une se basant sur les mécanismes d'intégration/excision du bactériophage lambda (Thiel et al., 2012).

2. Polarisation des méga-plasmides.

Les chromosomes sont organisés en deux réplichores de polarité opposée coïncidant avec l'orientation des fourches de réplication. Les réplichores arborent une composition en base asymétrique avec un brin enrichi en purines en comparaison à l'autre (GC skew) (Figure 22). Cette organisation est accompagnée par une orientation des gènes et de nombreux motifs de l'origine de réplication (*oriC*) vers la région opposée de terminaison de réplication (*ter*) (Hendrickson and Lawrence, 2006) (Touzain et al., 2011). Une grande partie de ces motifs ont des fonctions inconnues mais deux octamères: Chi (5'-GCTGGTGG-3') (Bianco and Kowalczykowski, 1997) et KOPS (5'-

GGGNAGGG-3') (Figure 22) (Bigot et al., 2005) (Levy et al., 2005) sont caractérisés fonctionnellement. Les sites Chi (Cross-over Hot-spot Instigator) sont impliqués dans la voie de recombinaison RecBCD (*cf.* Note de bas de page 2). Les sites KOPS orientent la translocation de FtsK (*cf.* B I revue FtsK). Une recherche généralisée des motifs avec les caractéristiques des KOPS a permis d'identifier des motifs homologues chez la plupart des espèces bactériennes (Hendrickson and Lawrence, 2006). Le motif 5'-GGGNAGGG-3', pourrait donc avoir le même rôle chez une large variété de bactéries. Toutefois, d'autres motifs semblent orienter la translocation de FtsK. Ces motifs ont été décrits et caractérisés chez *Bacillus Subtilis* (5'-GAGAAGGG-3') et *Lactococcus Lactis* (5'-GAAGAAG-3') (Ptacin et al., 2006) (Nolivos et al., 2012).

Le "but final" de l'activité de translocation de FtsK est d'arriver au site *dif*, et d'activer la résolution des dimères de chromosome. Cette orientation est possible grâce à la convergence des séquences KOPS vers *dif*. L'ensemble des données, présentées dans la partie C, suppose que le plasmide R27, mais aussi les autres méga-plasmides dont les sites ont été étudiés, ont une ségrégation dépendante de FtsK. Le plasmide R27 présente un biais de KOPS. Les séquences KOPS retrouvées sur ce réplicon sont homologues à celles du chromosome d'*E.coli*. La recherche de motifs 5'-GGGNAGGG-3' sur l'ensemble des méga-plasmides est indispensable. Elle permettrait d'apporter un argument supplémentaire pour affirmer que les méga-plasmides s'adaptent au cycle cellulaire bactérien. De plus, un contrôle de la ségrégation de type chromosomique d'un réplicon devrait s'accompagner d'une restructuration globale pour acquérir deux réplichores (Figure 22). Pour vérifier ce point là, une étude bio-informatique systématique des plasmides et méga-plasmides est essentielle. Les résultats que j'ai obtenus, additionnés aux données bio-informatiques, auront pour but de corréler l'acquisition d'un système de résolution de dimères chromosomique à l'acquisition de réplichores et de motifs biaisés. Ainsi, il sera facile d'affirmer que l'augmentation en taille d'un réplicon s'accompagne de l'acquisition de caractéristiques chromosomiques, transformant un plasmide en composant stable du génome bactérien (Chromide).

3. Plasmides/méga-plasmides/chromides/chromosomes.

L'objectif premier de cette étude était d'avoir une vision large des mécanismes de résolution de dimères en fonction de la taille des réplicons (Figure 22). Grâce à une étude du comportement d'une collection de sites de recombinaison *Xrs*, j'ai pu montrer qu'à partir d'une taille de réplicon d'environ 130 kpb, tous ces sites ont une région centrale de 6 pb et ne sont pas associés à des séquences accessoires. De plus leur mécanisme de résolution de dimères semble dépendant de FtsK. Chez les plasmides de petite taille, au contraire, sont retrouvés des sites à 6,7 ou 8 pb de bases centrales, associés ou non à des séquences accessoires. Il semblerait donc que l'augmentation en taille des réplicons s'accompagne de l'acquisition d'un mécanisme de résolution des dimères de type chromosomique (Figure 22).

L'hypothèse de départ reste que la domestication d'un plasmide en composant stable du génome que sont les chromides passe par l'acquisition d'un système de résolution de dimères de type chromosomique et une adaptation de l'origine de réplication (Figure 22). Au cours de cette thèse j'ai pu montrer que les méga-plasmides ont adopté un système de résolution de dimères chromosomique. Le passage de plasmide à méga-plasmide s'accompagnerait donc de l'adaptation du système de résolution de dimères de réplicon.

Les méga-plasmides ont un système de réplication de type plasmidique (Cain and Hall, 2013) (Page et al., 2001). Alors que les plasmides se répliquent plusieurs fois par cycle cellulaire, les chromides ne le font qu'une fois. Chez les α -protéobactéries, est retrouvé un groupe de méga-plasmides qui se répliquent une seule fois par cycle cellulaire. Ces méga-plasmides portent une origine de replication de type RepABC (Pinto et al., 2012). La seule étude du contrôle de la réplication d'un chromide a été faite chez *Vibrio cholerae*. Le chromosome secondaire (Ch.2.) ou chromide porte une origine homologue à celle des plasmides, *oriC2* et sa réplication est dépendante du facteur RctB (Duigou et al., 2006). RctB est une protéine de 658 AA qui se fixe à l'ADN sous forme monomérique ou dimérique (Jha et al., 2014). Une analyse fonctionnelle de l'origine de réplication de chromosome secondaire montre qu'elle peut être divisée en deux parties : une correspondant à l'origine minimale pour initier la réplication et l'autre correspondant à une région régulatrice connue comme la région d'incompatibilité (Inc) (Egan and Waldor, 2003). RctB a aussi la capacité de se fixer à un locus de l'*oriC1* n'ayant aucune homologie avec les séquences trouvées sur le Ch.2. La présence de ce site sur le

Ch.1 suggère l'existence d'une communication entre les deux chromosomes lors de la réplication. Cependant, le rôle de ces loci de fixation de RctB dans la coordination de la réplication chez *V.cholerae* est sujet à débat. De plus, la terminaison de réplication des deux chromosomes est synchrone. Ces deux caractéristiques sous entendent un dialogue indispensable entre les deux chromosomes pour assurer le maintien de l'information génétique. Une étude récente apporte de nouvelles données sur le mécanisme impliqué. En effet, le site de fixation de RctB sur le Ch.1, appelé *crtS*, est crucial pour l'initiation de la réplication du Ch.2. L'*oriC2* et *crtS* sont co-localisés dans la même région tout au long du cycle cellulaire et semblent être en contact. L'initiation de *oriC2* nécessite la réplication du locus *crtS*, suggérant qu'un changement de conformation induit par le passage de la fourche de réplication, ou un doublement du nombre de copies de *crtS*, déclenche la réplication du Ch.2 (Val et al., 2016). Malgré les données présentées sur le Ch.1. et le Ch.2. de *V.cholerae* le mécanisme de coordination des deux chromosomes reste largement incomplet. La compréhension fine du mécanisme de contrôle de la réplication du Ch.2. est importante pour comprendre comment les méga-plasmides pourraient devenir des chromides.

D- CONCLUSION ET DISCUSSION GENERALE

Tout au long de ma thèse je me suis intéressé à la recombinaison spécifique de site. Plus particulièrement au système Xer de résolution des dimères de chromosomes. Ce système est impliqué dans les transferts verticaux mais aussi dans les transferts horizontaux de gènes. Le système Xer représente donc un modèle pour étudier la balance entre le maintien et la variabilité de l'information génétique. J'ai pu aborder ces deux aspects en étudiant d'une part IMEXs et d'autre part les méga-plasmides. Le système Xer chromosomique catalyse une réaction de recombinaison entre deux sites *dif*, dépendamment de XerC, XerD et de l'activation FtsK. Lors de la résolution des dimères de chromosomes, la réaction de recombinaison est finement contrôlée dans le temps et dans l'espace par la translocase à ADN FtsK. Toutefois, le système Xer chromosomique est détourné de son rôle principal pour catalyser l'intégration et l'excision d'éléments génétiques mobiles appelés IMEXs. L'IMEX que j'ai étudié a un mécanisme d'intégration/excision identique au mécanisme de résolution des dimères de chromosome. Ce mécanisme est dépendant de XerC, XerD et de l'activation de XerD par le domaine γ de FtsK. La forme intra-chromosomique du GGI est extrêmement stable. J'ai montré que l'activité de translocation de FtsK inhibait la réaction de recombinaison catalysant l'excision du GGI.

Les transferts verticaux de l'information génétique prennent en compte la composition des génomes bactériens, composés de deux types principaux de réplicons : les chromosomes et les plasmides. Toutefois, ces dernières années, la description de la composition des génomes bactériens s'est complexifiée. Les termes de chromides ou de méga-plasmides sont apparus. Les chromides correspondent aux chromosomes secondaires (*e.g.* le chromosome secondaire de *V.cholerae*). Les méga-plasmides peuvent être aussi grands que des chromides, mais ne portent pas de gènes essentiels. Cette diversité de réplicons nous a laissé penser que l'adaptation de plasmides en composants stables du génome était possible. En comparant plasmides et chromosomes, deux systèmes sont différenciellement contrôlés : l'initiation de la réplication et la résolution des dimères de réplicons. Le système de résolution des dimères de plasmides est dépendant de la formation d'un filtre topologique par l'interaction de séquences et protéines accessoires. Le système de résolution de dimères de chromosomes est dépendant de FtsK et est couplé au cycle cellulaire de la bactérie. J'ai montré que les méga-plasmides, d'une taille supérieure à 130 Kpb, sont capables de résoudre leurs

dimères *via* un système chromosomique. La différence de taille entre plasmides et méga-plasmides est donc accompagnée du passage d'un système de résolution de dimères plasmidique à un système de résolution de dimères chromosomique.

Pour terminer, j'aborderai et discuterai une dernière notion qui me semble importante. Le système Xer correspond à une machinerie de recombinaison simple dont les acteurs principaux sont généralement un site de recombinaison et deux recombinases XerC et XerD. Selon les cas étudiés, différents acteurs externes vont être impliqués pour activer la recombinaison (*i.e* FtsK, ArgR, PepA, EndoIII). La nature du site de recombinaison semble imposer l'intervention de protéines activatrices différentes. La nature du site de recombinaison correspond à sa composition en base. Au cours de ma thèse j'ai pu étudier toute une collection de sites de recombinaison ayant des compositions en bases différentes. Les sites de recombinaison de type chromosomique (*dif_{Ec}*) sont composés de deux sites de fixation pour XerC et XerD de 11pb séparés d'une région centrale de 6 pb. Chaque paire de bases composant les bras de fixation est importante pour soit la fixation, soit l'activité catalytique des recombinases. Le bras de fixation pour XerD est plus conservé que le bras de fixation pour XerC. J'ai montré que 4 paires de bases divergentes entre le site *dif* chromosomique *dif_{Ng}* et le site présent sur un GGI, *dif_{GGI}*, entraîne l'inhibition de la réaction de recombinaison. FtsK ne reconnaît pas le complexe formé sur *dif_{GGI}* et *via* son activité de translocation, et le détruit. Les sites de recombinaison de R27 (*Xr_{S_{R27}}*) et *dif_{Ec}* sont divergents de 4 paires de bases. Un complexe *Xr_{S_{R27}}*/XerCD a la capacité d'arrêter la translocation de FtsK. L'altération de bases sur le bras de fixation de XerC n'empêche pas la reconnaissance du complexe par FtsK. L'ensemble des sites *Xrs* des méga-plasmides étudiés ont un bras de fixation pour XerD conservé, leurs bras de fixation pour XerC sont plus divergents. Ils ont tous une activité de recombinaison dépendante de FtsK. Il serait donc possible que la pression de sélection pour conserver le bras de fixation pour XerD soit due à l'activité de translocation de FtsK. En effet, il est indispensable pour l'activation de la réaction de recombinaison, catalysant la résolution des dimères de chromosomes, que FtsK s'arrête sur le complexe XerCD/*dif* pour l'activer.

E- MATERIEL ET METHODES

1. Purification des protéines du système Xer de *Neisseria gonorrhoeae*

Les différentes protéines du système Xer de *Neisseria gonorrhoeae* sont étiquetées histidine/thiorédoxine. Les plasmides d'expressions (*cf.* ANNEXE 3) sont utilisés pour transformer la souche d'*Escherichia coli* BL2-DE3. Les transformants obtenus sont mis en culture dans du LB additionné d'Ampicilline sur la nuit à 37°C. Cette culture de nuit est diluée le matin au 1/100^{ème} et mis en culture dans du LB à 37°C jusqu'à une DO600 égale à 0,6. Avant l'induction les cultures sont mises en agitation à 42°C pendant 10 minutes, puis à 17°C pendant 10 minutes. L'induction est faite à 17°C. Après 4h d'induction à 1µM IPTG, les cultures sont aliquotées puis centrifugées à 5000rpm pendant 10minutes. Les culots sont re-suspendus (tampon à 50mM Tris HCl pH8, 300mM NaCl, 10% glycerol, 1mg/ml de lysosyme, 230µg/ml RNaseA et protéase (cocktail Roche®)), soniqués (3 x 30 secondes) puis centrifugés 1 heure à 13 000 rpm. La lyse se termine par un passage à l'azote liquide. Les protéines taguées histidine sont purifiées sur colonne de nickel (Histrap™ FF crude 1ml, GE Healthcare) suivie par une colonne héparine (HiTrap™ Heparine HP, 1ml, GE healthcare). La dernière étape consiste en une colonne de filtration sur gel (HiLoad™ 16/60 Superdex 200, GE Healthcare). Les recombinaisons purifiées ont été concentrées (Vivaspin concentrator 6ml, Sartorius stedim®) et stockées à -80°C. A chaque étape, un échantillon est prélevé, ces échantillons sont ensuite utilisés pour vérification par un gel polyacrylamide précoulé (Mini-PROTEAN®TGXTM (BIO- RAD))

2. Expériences de retards électrophorétiques de migration

Le marquage des oligonucléotides a été effectué en 5'. L'oligonucléotide bottom, formant le brin inférieur de l'ADN, a été marqué avec du γ -³²P par la T4 polynucléotide Kinase (*cf.* ANNEXE 3) (Thermo Scientific®). Le marquage est réalisé à 37°C pendant 45 minutes, suivi d'une étape de dénaturation de la T4 polynucléotide Kinase à 65°C pendant 10 minutes. Par la suite, à l'oligonucléotide marqué est ajouté en quantité deux

fois plus importante l'oligonucléotide complémentaire (top) (cf. ANNEXE 3). L'hybridation des deux oligonucléotides complémentaires a été effectuée en chauffant à 100°C pendant 3 minutes et en laissant diminuer la température sur la nuit. Dans le but d'éliminer l'élément radioactif non fixé à l'ADN, le produit d'hybridation est passé sur colonne MicroSpin G-25 (GE Healthcare). L'ADN marqué radioactivement ainsi obtenu est purifié sur gel de polyacrylamide. Les oligonucléotides marqués de 28pb sont déposés sur un gel polyacrylamide 10% à 150Volts pendant 1h30 à température ambiante. Les bandes d'intérêt ont été révélées après exposition de 1 minute sur un film Kodak, puis découpées dans le gel. L'ADN a été élué du gel sur la nuit dans un tampon à 10mM Tris HCl pH8, 1mM EDTA, 0,2% SDS, 0,3M NaCl et 1µg/ml d'ARN. L'ADN a ensuite été purifié par précipitation à l'éthanol.

Les réactions ont été effectuées dans une concentration en NaCl égale à 150mM dans un volume final de 10µl. Le tampon dans lequel est effectuée la réaction contient 35mM Tris HCl pH8, 10% de glycérol, 2mM EDTA, 2mM DTT, 2,5mM MgCl₂, 0,25mg/ml de polydIdC et 3000cpm d'ADN radiomarké ainsi que des concentrations croissantes en protéines (les concentrations en protéines sont indiquées dans les résultats partie B et C). Les réactions ont été incubées 30 minutes à 30°C puis déposées sur un gel d'électrophorèse natif TGE à 8% de polyacrylamide contenant 25mM de tris base, 190mM de glycine et 1mM d'EDTA. La migration s'effectue à 150Volts pendant 2h30 à 4°C. Les gels sont ensuite séchés et exposés sur la nuit dans une cassette. L'écran est analysé à l'aide du Typhoon TRIO GE®.

3. Tethered Particle Motion multiplexé (HT-TPM)

a- Préparation des lames de verre

Il faut que les lames de verre soient extrêmement propres. Utiliser des lames de verre de 24x36 cm, ces lames sont trouées quatre fois pour pouvoir former les chambres d'incubation. Rincer rapidement les lames à l'éthanol, puis les immerger dans un cristallisateur rempli d'éthanol pur, passer au bain à ultrasons pendant 5 minutes. Sécher les lames sous flux d'air puis 5 minutes à l'étuve à 110°C. Sortir les lames et les laisser refroidir, les passer ensuite dans de l'acide sulfochromique (sous hôte) pendant 30 minutes minimum. Rincer avec 1 Litre d'eau puis laisser les lames dans l'eau pour éviter qu'elles ne se collent entre elles. Rincer les lames sous un flux d'air puis 5 minutes à 110°C. Les lames propres peuvent être époxydées. La réaction d'époxydation se fait pendant 1 heure et 30 minutes dans une solution contenant :

- 19,5 ml d'isopropanol
- 0,2 ml H₂O mq
- 0,5 ml de 3-Glycidoxypropyldiméthoxyméthylsilane GPDMS (Sigma 539252)
- 20 µl de N,N-Diméthylbenzylamine (Sigma 185582)

Après cette réaction rincer les lames à l'isopropanol puis les immerger dans un cristallisateur avec de l'isopropanol et les mettre au bain à ultrasons pendant 5 minutes. Pour finir sécher les lames sous un flux d'air et les passer 15 minutes à 110°C.

c- Microcontact printing

Le but de cette étape est de déposer la neutravidine de manière organisée sur les lames époxydées, ces carrés de neutravidine font 80 nm et sont espacés de 3 µm. Cette étape nécessite la préparation au préalable de timbres PDMS (Plénat et al., 2012). Se placer sur une grande plaque de verre. Déposer, sur les lames trouées et propres, les patches de silicones qui vont définir les chambres. Séparer les timbres PDMS de la puce en Silicium à l'aide d'une pince. Poser le timbre sur la plaque en verre les motifs vers le haut. Incuber sur le timbre 20 µl de neutravidine (Invitrogen-A6373) à 20µl/ml (diluée dans du PBS pH 7,4) pendant 1 minute. Rincer immédiatement à l'eau et passer sous flux d'air (ne pas trop sécher le timbre). Retourner les timbres et les déposer sur la lame de

verre dans les espaces définis par les patches de silicones, laisser 1 minute puis retirer le timbre, en faisant attention de ne pas laisser traîner le timbre sur la surface.

c- Interaction ADN/billes et fixation des complexes à la lame

Préparer les chambres entre lames et lamelles. Cette chambre a un volume d'environ 10 ml. Préparer le Tampon A (TpA): PBS 1X, Pluronic 127 1 mg/ml, BSA (filtrée) 0,1mg/ml, Tween 20 0,1%, Triton X100 0,05%. Rincer la chambre avec 30 volumes de TpA, soit 300 ml et laisser incuber pendant 30minutes (par exemple : 5µL à 100pM de billes avec 5µL d'ADN à 100pM, la solution stock de billes est à 500pM, il faut donc 1µL de stock dans 4µL de TpA). Après les 30 minutes d'incubation de la chambre, rincer à nouveau avec 30 volumes de TpA. Injecter ensuite 10 µl de complexe ADN/billes et laisser incuber sur la nuit à 4°C dans une chambre humide. Avant utilisation, le lendemain, rincer à nouveau avec 30 volumes de TpA, sans faire de bulles.

d- Formation des synapses de recombinaison

Laver les chambres avec le tampon qui servira à la réaction de formation des synapses. Ce tampon contient 10 mM TrisHCl pH 8, 160 mM NaCl, 1mM MgCl₂, 1 mg/ml Pluronic F-127. Attention de ne pas faire de bulles d'air dans la chambre, elles colleraient l'ADN à la lame de verre, même en présence de Pluronic. L'acquisition des données est faite à 22°C, ne pas oublier de thermostatier la pièce. L'étape initiale suit le mouvement brownien des billes sans protéines pendant 2 minutes, l'injection des protéines doit être rapide. Les concentrations des protéines injectées sont indiquées dans les résultats partie B. L'acquisition est faite sur 25 minutes.

4. Recombinaison *in vitro*

Les réactions de recombinaison sont effectuées dans un tampon contenant 25mM de Tris HCl pH7,5, 10mM de MgCl₂ et de 1% de PEG 8000. L'ADN et les protéines sont mélangés au tampon à température ambiante avant l'ajout de 2,5mM d'ATP. La réaction est ensuite placée à 30°C pendant 2 heures. Lorsque FtsK est utilisé sous la forme t-FtsK $\alpha\beta\gamma$, la réaction est arrêtée dans un tampon contenant 10% de SDS et 2 mg/ml de protéinase K et un passage à 42°C pendant 30 minutes. Les réactions sont ensuite analysées par un gel d'agarose 0,8% TBE 1X, la migration se fait à 70Volts pendant 1h30. L'ADN est visualisé à l'aide du Sybr Green par l'utilisation du Typhoon TRIO GE®. Lorsque la réaction de recombinaison est faite en utilisant le sous domaine γ de FtsK fusionné à XerD (XerD γ_{Ng}), la réaction se fait dans le même tampon dans des conditions identiques. L'ADN est ensuite purifié par une extraction au phénol/chloroforme suivie d'une précipitation à l'éthanol. L'ADN est resuspendu dans 15 ml d'eau mq puis digéré par NcoI et ScaI (Fermentas). La réaction est ensuite visualisée comme précédemment.

5. Recombinaison *in vivo* (excision et intégration)

α - Excision/délétion de cassette

Transformer les souches voulues (*cf.* ANNEXE 2) par les plasmides portant les variants du gène *xerDNg* sous le contrôle du promoteur pBAD. Etaler la transformation sur LA additionné d'ampicilline et 1 % d'arabinose. Le lendemain, mettre en culture une dizaine de clones dans 1 ml de LB à 37°C pendant 6 heures. Diluer la culture de jour jusqu'à 10⁻⁶ et étaler les dilutions 10⁻⁵ et 10⁻⁶ sur LA additionné d'ampicilline (50 μ g/ml). Le lendemain strier 100 clones sur une boîte LA additionné de Kanamicyne (25

µg/ml). Les clones qui seront sensibles à la Kanamycine auront excisés la cassette. Le taux de recombinaison correspond au nombre de Kanamycine sensibles sur 100.

Pour la délétion de cassette sur plasmide, les souches d'intérêt sont transformées par les plasmides dont la liste est disponible en ANNEXE 2, puis étalées sur LA additionné d'Ampicilline (50 µg/ml). Le lendemain, une dizaine de clones sont mis en culture ensemble pendant 6 heures, l'ADN est extrait par mini-prep (QIAprep® Spin Qiagen). Le résultat est analysé sur gel agarose 1% TAE 1X et visualisé au BET.

b- Intégration d'un mini-GGI

Les souches de départ (*cf.* ANNEXE 2) ont été transformées par les plasmides thermo-sensibles qui portent soit *dif_{Ng}* soit *dif_{GGI}* puis rendues compétentes. Les souches résultantes sont transformées par les plasmides qui portent le gène codant les différents variants de *xerD_{Ng}* puis étalées sur LA additionné d'Ampicilline (50 µg/ml) (sans induction à l'Arabinose). Le lendemain, mettre en culture une dizaine de clones dans 1ml de LB avec agitation à 30°C pendant 6 heures. Diluer jusqu'à 10⁻⁶ et spoter chaque dilution sur LA additionné d'Ampicilline et Spectinomycine (10µg/ml), et mettre en culture soit à 30°C soit à 42°C. Pour la quantification de l'intégration, étaler 100 µl de la dilution 10⁻⁴ ou 10⁻⁵ sur LA additionné d'Ampicilline et Spectinomycine (10µg/ml) et mettre en culture soit à 30°C soit à 42°C. Le lendemain compter le nombre de clones qui ont poussé aux deux températures. Le pourcentage d'intégration correspond au nombre de clones qui poussent à 42°C sur le nombre de clones qui poussent à 30°C, multiplié par 100.

6. Test de translocation

Les molécules d'ADN utilisées ont été obtenues par PCR à partir des plasmides et amorces présentés en ANNEXE 3. Les produits PCR sont biotinylés du côté où ils portent le site de recombinaison spécifique de site. La séparation entre le site d'intérêt et la biotine est d'environ 15 pb. L'ADN obtenu est ensuite purifié sur gel LM-Agarose 1% en utilisant le kit Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega®).

L'ADN obtenu est ensuite fixé à des billes magnétiques portant des molécules de streptavidine (Streptavidine MagneSphere (Promega®)). Pour cela, les billes sont sorties du frigo et mises à température ambiante pendant 30 minutes, lavées deux fois au PBS 1X (Phosphate Buffered Saline), puis deux fois avec du RB 2X (25 mM Tris·HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂). Pour laver les billes magnétiques il faut les précipiter sur un portoir, enlever le surnageant, puis resuspendre les billes dans le nouveau tampon avant de réitérer. L'interaction entre billes et ADN est faite dans du RB2X à température ambiante pendant 30 minutes. Le rapport pour favoriser l'interaction bille/ADN est de 15ng d'ADN par μ l de billes. Dans le but d'éliminer le plus d'ADN non fixé aux billes, la réaction doit être lavée deux fois avec du tampon RB2X et resuspendue dans 20 μ l de RB2X.

La réaction de translocation se fait dans un tampon contenant 25 mM Tris·HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 10% (vol/vol) glycerol, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 250 mM NaCl. chaque réaction contient 45 ng d'ADN et chaque protéine est ajoutée selon les concentrations qui sont décrites dans les résultats partie B et C. La réaction dure 1min (à partir du moment où est ajouté 5 mM d'ATP), les billes sont précipitées. Le surnageant est récupéré et placé à 42°C pendant 15 minutes dans un tampon contenant 10% de SDS, 2 mg/ml de protéinase K et 0,01mg/ml de biotine. Cette étape sert à arrêter la réaction. L'ADN relâché par l'activité de translocation est analysé via un gel agarose 0,8% TBE 1X et visualisé par Syber Green à l'aide du Typhoon-Trio-GE.

7. Inhibition de la jonction de Holliday

Les tests d'inhibition de la formation de jonction sont effectués sur un ADN linéaire obtenu par digestion des plasmides pFF01 et pFF03 (cf. ANNEXE 3) par NdeI

(Fermentas). La digestion se fait sur 5 heures. La forme linéaire du plasmide est ensuite purifiée sur gel LM-agarose 1%. La réaction est effectuée dans un tampon contenant 25 mM de TrisHCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 0,5% de glycerol, 0,02 mM EDTA, 0,02mM DTT, 0,1% PEG 8000, 75 mM NaCl (avec ou sans 6,25 mM ATP). La réaction contient 50ng d'ADN et les protéines, dont les concentrations sont indiquées dans les résultats partie B. La réaction est faite à température ambiante pendant 20 minutes. L'ADN est ensuite purifié par une extraction au phénol/chloroforme suivie d'une précipitation à l'éthanol. L'ADN est resuspendu dans 15 µl d'eau mq puis digéré par NcoI (Fermentas). Les produits sont analysés par électrophorèse Agarose 0,8% TBE 1X et visualisés par Sybr Green à l'aide du Typhoon-Trio-GE.

8. Test Co-cultures

Les expériences de co-culture s'étalent sur la semaine. Le premier jour, le matin, les souches qui seront mises en compétition sont mises en culture liquide dans 5 ml de LB, jusqu'à atteindre la phase stationnaire. Le soir du premier jour dans un tube de 1,5ml mélanger en proportions égales les deux souches en compétition (500 µl de chaque) et vortexer. Mettre 4,88 µl de ce mélange dans 5ml de LB, et mettre en 37°C sous agitation pendant la nuit. Ce mélange est aussi utilisé pour faire le t₀, pour cela faire une dilution à 1/500^{ème} (volume final = 1 ml) dans les tubes à cytomètre. En parallèle allumer le Cytomètre (Cyflow Partec®), une quinzaine de minutes avant de s'en servir pour laisser le temps au laser de chauffer et nettoyer le cytomètre Puis faire la mesure. Puis rincer le cytomètre à nouveau. Tous les matins de la semaine diluer la culture de nuit à raison de 4,88 µl pour 5 ml de LB (la culture sur la journée doit être de 6 heures minimum). Le soir, faire la mesure au cytomètre en diluant la culture de jour au 1/500^{ème}.

9. Test de stabilité de R27

Les souches d'intérêt sont conjuguées par les mutants de R27 voulus (*cf.* ANNEXE 2). Mettre en culture liquide un mélange de quatre clones dans 5 ml de LB additionné de Tétracycline (25 µg/ml) pendant 8 heures à 37°C (sur la journée). Le soir diluer au 1/10^{ème} et mettre en culture 48,8 µl de cette dilution au 1/10^{ème} dans 5 ml de LB sans antibiotique sur la nuit à 37°C. Le lendemain matin, premier jour de l'expérience, faire une dilution au 1/10^{ème} de la culture de nuit et mettre en culture 48,8 µl de cette dilution au 1/10^{ème} dans 5 ml de LB à 37°C pendant 8 heures (sur la journée). Le soir, faire une dilution de la culture de jour jusqu'à 10⁻⁵, prendre 48,8 µl de la dilution 10⁻¹ et la remettre en culture comme la veille. Etaler 100 µl de la dilution 10⁻⁵ sur LA additionné de Streptomycine (200 µg/ml) et X-gal (60 µg/ml) puis mettre à 37°C sur la nuit. Le lendemain (second jour de l'expérience) recommencer le protocole du premier jour de l'expérience et compter le nombre de colonies blanches et bleues du jour d'avant. Cette expérience se fait sur cinq jours.

F- BIBLIOGRAPHIE

- Alén, C., Sherratt, D.J., and Colloms, S.D. (1997). Direct interaction of aminopeptidase A with recombination site DNA in Xer site-specific recombination. *EMBO J.* *16*, 5188–5197.
- Alonso, G., Baptista, K., Ngo, T., and Taylor, D.E. (2005). Transcriptional organization of the temperature-sensitive transfer system from the IncHI1 plasmid R27. *Microbiol. Read. Engl.* *151*, 3563–3573.
- Arutyunov, D., and Frost, L.S. (2013). F conjugation: back to the beginning. *Plasmid* *70*, 18–32.
- Aussel, L., Barre, F.-X., Aroyo, M., Stasiak, A., Stasiak, A.Z., and Sherratt, D. (2002). FtsK Is a DNA Motor Protein that Activates Chromosome Dimer Resolution by Switching the Catalytic State of the XerC and XerD Recombinases. *Cell* *108*, 195–205.
- Balding, C., Blaby, I., and Summers, D. (2006). A mutational analysis of the ColE1-encoded cell cycle regulator Rcd confirms its role in plasmid stability. *Plasmid* *56*, 68–73.
- Barre, F.X., Søballe, B., Michel, B., Aroyo, M., Robertson, M., and Sherratt, D. (2001). Circles: the replication-recombination-chromosome segregation connection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 8189–8195.
- Baxter, J.C., and Funnell, B.E. (2014). Plasmid Partition Mechanisms. *Microbiol. Spectr.* *2*.
- Bedbrook, J.R., and Ausubel, F.M. (1976). Recombination between bacterial plasmids leading to the formation of plasmid multimers. *Cell* *9*, 707–716.
- Bell, J.C., and Kowalczykowski, S.C. (2016). RecA: Regulation and Mechanism of a Molecular Search Engine. *Trends Biochem. Sci.* *41*, 491–507.
- Bianco, P.R., and Kowalczykowski, S.C. (1997). The recombination hotspot Chi is recognized by the translocating RecBCD enzyme as the single strand of DNA containing the sequence 5'-GCTGGTGG-3'. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 6706–6711.
- Bigot, S., Saleh, O.A., Lesterlin, C., Pages, C., El Karoui, M., Dennis, C., Grigoriev, M., Allemand, J.-F., Barre, F.-X., and Cornet, F. (2005). KOPS: DNA motifs that control *E. coli* chromosome segregation by orienting the FtsK translocase. *EMBO J.* *24*, 3770–3780.
- Bischerour, J., Spangenberg, C., and Barre, F.-X. (2012). Holliday junction affinity of the base excision repair factor Endo III contributes to cholera toxin phage integration: Cholera toxin genes acquisition. *EMBO J.* *31*, 3757–3767.
- Blakely, G.W., and Sherratt, D.J. (1994). Interactions of the site-specific recombinases XerC and XerD with the recombination site dif. *Nucleic Acids Res.* *22*, 5613–5620.
- Blakely, G., May, G., McCulloch, R., Arciszewska, L.K., Burke, M., Lovett, S.T., and Sherratt, D.J. (1993). Two related recombinases are required for site-specific recombination at dif and cer in *E. coli* K12. *Cell* *75*, 351–361.
- Bonné, L., Bigot, S., Chevalier, F., Allemand, J.-F., and Barre, F.-X. (2009). Asymmetric

DNA requirements in Xer recombination activation by FtsK. *Nucleic Acids Res.* **37**, 2371–2380.

Bregu, M., Sherratt, D.J., and Colloms, S.D. (2002). Accessory factors determine the order of strand exchange in Xer recombination at *psi*. *EMBO J.* **21**, 3888–3897.

Brunet, A., Chevalier, S., Destainville, N., Manghi, M., Rousseau, P., Salhi, M., Salomé, L., and Tardin, C. (2015). Probing a label-free local bend in DNA by single molecule tethered particle motion. *Nucleic Acids Res.* **43**, e72.

Buchrieser, C., Glaser, P., Rusniok, C., Nedjari, H., D’Hauteville, H., Kunst, F., Sansonetti, P., and Parsot, C. (2000). The virulence plasmid pWR100 and the repertoire of proteins secreted by the type III secretion apparatus of *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.* **38**, 760–771.

Cain, A.K., and Hall, R.M. (2013). Evolution of IncHI1 plasmids: two distinct lineages. *Plasmid* **70**, 201–208.

Cambray, G., Guerout, A.-M., and Mazel, D. (2010). Integrins. *Annu. Rev. Genet.* **44**, 141–166.

Capiaux, H., Lesterlin, C., Péral, K., Louarn, J.M., and Cornet, F. (2002). A dual role for the FtsK protein in *Escherichia coli* chromosome segregation. *EMBO Rep.* **3**, 532–536.

Carnoy, C., and Roten, C.-A. (2009). The dif/Xer recombination systems in proteobacteria. *PloS One* **4**, e6531.

Chan, Y.A., Hackett, K.T., and Dillard, J.P. (2012). The Lytic Transglycosylases of *Neisseria gonorrhoeae*. *Microb. Drug Resist.* **18**, 271–279.

Chant, E.L., and Summers, D.K. (2007). Indole signalling contributes to the stable maintenance of *Escherichia coli* multicopy plasmids. *Mol. Microbiol.* **63**, 35–43.

Chen, Y., Narendra, U., Iype, L.E., Cox, M.M., and Rice, P.A. (2000). Crystal structure of a Flp recombinase-Holliday junction complex: assembly of an active oligomer by helix swapping. *Mol. Cell* **6**, 885–897.

Chimerel, C., Field, C.M., Piñero-Fernandez, S., Keyser, U.F., and Summers, D.K. (2012). Indole prevents *Escherichia coli* cell division by modulating membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta* **1818**, 1590–1594.

Cloud, K.A., and Dillard, J.P. (2002). A lytic transglycosylase of *Neisseria gonorrhoeae* is involved in peptidoglycan-derived cytotoxin production. *Infect. Immun.* **70**, 2752–2757.

Colloms, S.D. (2013). The topology of plasmid-monomerizing Xer site-specific recombination. *Biochem. Soc. Trans.* **41**, 589–594.

Colloms, S.D., Sykora, P., Szatmari, G., and Sherratt, D.J. (1990). Recombination at *ColE1* requires the *Escherichia coli* *xerC* gene product, a member of the lambda integrase

family of site-specific recombinases. *J. Bacteriol.* **172**, 6973–6980.

Colloms, S.D., Bath, J., and Sherratt, D.J. (1997). Topological selectivity in Xer site-specific recombination. *Cell* **88**, 855–864.

Colloms, S.D., Alén, C., and Sherratt, D.J. (1998). The ArcA/ArcB two-component regulatory system of *Escherichia coli* is essential for Xer site-specific recombination at *psi*. *Mol. Microbiol.* **28**, 521–530.

Cornet, F., Mortier, I., Patte, J., and Louarn, J.M. (1994). Plasmid pSC101 harbors a recombination site, *psi*, which is able to resolve plasmid multimers and to substitute for the analogous chromosomal *Escherichia coli* site *dif*. *J. Bacteriol.* **176**, 3188–3195.

Cortez, D., Quevillon-Cheruel, S., Gribaldo, S., Desnoues, N., Sezonov, G., Forterre, P., and Serre, M.-C. (2010). Evidence for a Xer/*dif* system for chromosome resolution in archaea. *PLoS Genet.* **6**, e1001166.

Cox, M.M., Goodman, M.F., Kreuzer, K.N., Sherratt, D.J., Sandler, S.J., and Marians, K.J. (2000). The importance of repairing stalled replication forks. *Nature* **404**, 37–41.

Crozat, E., Meglio, A., Allemand, J.-F., Chivers, C.E., Howarth, M., Vénien-Bryan, C., Grainge, I., and Sherratt, D.J. (2010). Separating speed and ability to displace roadblocks during DNA translocation by FtsK. *EMBO J.* **29**, 1423–1433.

Crozat, E., Fournes, F., Cornet, F., Hallet, B., and Rousseau, P. (2014a). Resolution of Multimeric Forms of Circular Plasmids and Chromosomes. *Microbiol. Spectr.* **2**.

Crozat, E., Rousseau, P., Fournes, F., and Cornet, F. (2014b). The FtsK family of DNA translocases finds the ends of circles. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 396–408.

Darmon, E., and Leach, D.R.F. (2014). Bacterial genome instability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **78**, 1–39.

Das, B., Bischerour, J., Val, M.-E., and Barre, F.-X. (2010). Molecular keys of the tropism of integration of the cholera toxin phage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 4377–4382.

Das, B., Bischerour, J., and Barre, F.-X. (2011a). Molecular mechanism of acquisition of the cholera toxin genes. *Indian J. Med. Res.* **133**, 195–200.

Das, B., Bischerour, J., and Barre, F.-X. (2011b). VGJ integration and excision mechanisms contribute to the genetic diversity of *Vibrio cholerae* epidemic strains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 2516–2521.

Das, B., Martínez, E., Midonet, C., and Barre, F.-X. (2013). Integrative mobile elements exploiting Xer recombination. *Trends Microbiol.* **21**, 23–30.

Debowski, A.W., Gauntlett, J.C., Li, H., Liao, T., Sehnal, M., Nilsson, H.-O., Marshall, B.J., and Benghezal, M. (2012a). Xer-cise in *Helicobacter pylori*: one-step transformation for the construction of markerless gene deletions. *Helicobacter* **17**, 435–443.

Debowski, A.W., Carnoy, C., Verbrugghe, P., Nilsson, H.-O., Gauntlett, J.C., Fulurija, A., Camilleri, T., Berg, D.E., Marshall, B.J., and Benghezal, M. (2012b). Xer recombinase and genome integrity in *Helicobacter pylori*, a pathogen without topoisomerase IV. *PloS One* 7, e33310.

Diagne, C.T., Salhi, M., Crozat, E., Salomé, L., Cornet, F., Rousseau, P., and Tardin, C. (2014). TPM analyses reveal that FtsK contributes both to the assembly and the activation of the XerCD-dif recombination synapse. *Nucleic Acids Res.* 42, 1721–1732.

Dominguez, N.M., Hackett, K.T., and Dillard, J.P. (2011). XerCD-Mediated Site-Specific Recombination Leads to Loss of the 57-Kilobase Gonococcal Genetic Island. *J. Bacteriol.* 193, 377–388.

Duggin, I.G., Dubarry, N., and Bell, S.D. (2011). Replication termination and chromosome dimer resolution in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *EMBO J.* 30, 145–153.

Duigou, S., Knudsen, K.G., Skovgaard, O., Egan, E.S., Løbner-Olesen, A., and Waldor, M.K. (2006). Independent control of replication initiation of the two *Vibrio cholerae* chromosomes by DnaA and RctB. *J. Bacteriol.* 188, 6419–6424.

Egan, E.S., and Waldor, M.K. (2003). Distinct replication requirements for the two *Vibrio cholerae* chromosomes. *Cell* 114, 521–530.

Field, C.M., and Summers, D.K. (2011). Multicopy plasmid stability: revisiting the dimer catastrophe. *J. Theor. Biol.* 291, 119–127.

Forns, N., Baños, R.C., Balsalobre, C., Juárez, A., and Madrid, C. (2005). Temperature-dependent conjugative transfer of R27: role of chromosome- and plasmid-encoded Hha and H-NS proteins. *J. Bacteriol.* 187, 3950–3959.

Fournes, F., Crozat, E., Pages, C., Tardin, C., Salomé, L., Cornet, F., and Rousseau, P. (2016). FtsK translocation permits discrimination between an endogenous and an imported Xer/dif recombination complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*

Fricke, W.F., Kusian, B., and Bowien, B. (2009). The genome organization of *Ralstonia eutropha* strain H16 and related species of the Burkholderiaceae. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 16, 124–135.

Gabant, P., Newnham, P., Taylor, D., and Couturier, M. (1993). Isolation and location on the R27 map of two replicons and an incompatibility determinant specific for IncHI1 plasmids. *J. Bacteriol.* 175, 7697–7701.

Garner, E.C., Campbell, C.S., and Mullins, R.D. (2004). Dynamic instability in a DNA-segregating prokaryotic actin homolog. *Science* 306, 1021–1025.

Garner, E.C., Campbell, C.S., Weibel, D.B., and Mullins, R.D. (2007). Reconstitution of DNA segregation driven by assembly of a prokaryotic actin homolog. *Science* 315, 1270–1274.

- Ghosh, K., Lau, C.-K., Gupta, K., and Van Duyne, G.D. (2005). Preferential synapsis of loxP sites drives ordered strand exchange in Cre-loxP site-specific recombination. *Nat. Chem. Biol.* *1*, 275–282.
- Ghosh, K., Guo, F., and Van Duyne, G.D. (2007). Synapsis of loxP sites by Cre recombinase. *J. Biol. Chem.* *282*, 24004–24016.
- Gibb, B., Gupta, K., Ghosh, K., Sharp, R., Chen, J., and Van Duyne, G.D. (2010). Requirements for catalysis in the Cre recombinase active site. *Nucleic Acids Res.* *38*, 5817–5832.
- Gilmour, M.W., Thomson, N.R., Sanders, M., Parkhill, J., and Taylor, D.E. (2004). The complete nucleotide sequence of the resistance plasmid R478: defining the backbone components of incompatibility group H conjugative plasmids through comparative genomics. *Plasmid* *52*, 182–202.
- Graham, J.E., Sivanathan, V., Sherratt, D.J., and Arciszewska, L.K. (2010). FtsK translocation on DNA stops at XerCD-dif. *Nucleic Acids Res.* *38*, 72–81.
- Grainge, I. (2010). FtsK--a bacterial cell division checkpoint? *Mol. Microbiol.* *78*, 1055–1057.
- Grainge, I., Lesterlin, C., and Sherratt, D.J. (2011). Activation of XerCD-dif recombination by the FtsK DNA translocase. *Nucleic Acids Res.* *39*, 5140–5148.
- Grindley, N.D.F., Whiteson, K.L., and Rice, P.A. (2006). Mechanisms of site-specific recombination. *Annu. Rev. Biochem.* *75*, 567–605.
- Guhathakurta, A., Viney, I., and Summers, D. (1996). Accessory proteins impose site selectivity during Cole1 dimer resolution. *Mol. Microbiol.* *20*, 613–620.
- Guo, F., Gopaul, D.N., and van Duyne, G.D. (1997). Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature* *389*, 40–46.
- Guo, F., Gopaul, D.N., and Van Duyne, G.D. (1999). Asymmetric DNA bending in the Cre-loxP site-specific recombination synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 7143–7148.
- Guo, X., Flores, M., Mavingui, P., Fuentes, S.I., Hernández, G., Dávila, G., and Palacios, R. (2003). Natural genomic design in *Sinorhizobium meliloti*: novel genomic architectures. *Genome Res.* *13*, 1810–1817.
- Hallet, B. (2001). Playing Dr Jekyll and Mr Hyde: combined mechanisms of phase variation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* *4*, 570–581.
- Hallet, B., Arciszewska, L.K., and Sherratt, D.J. (1999). Reciprocal control of catalysis by the tyrosine recombinases XerC and XerD: an enzymatic switch in site-specific recombination. *Mol. Cell* *4*, 949–959.
- Harrison, P.W., Lower, R.P.J., Kim, N.K.D., and Young, J.P.W. (2010). Introducing the

bacterial “chromid”: not a chromosome, not a plasmid. *Trends Microbiol.* 18, 141–148.

Hayes, F., and Sherratt, D.J. (1997). Recombinase binding specificity at the chromosome dimer resolution site *dif* of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 266, 525–537.

Heidelberg, J.F., Eisen, J.A., Nelson, W.C., Clayton, R.A., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Umayam, L., et al. (2000). DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* 406, 477–483.

Hendrickson, H., and Lawrence, J.G. (2006). Selection for chromosome architecture in bacteria. *J. Mol. Evol.* 62, 615–629.

Hodgman, T.C., Griffiths, H., and Summers, D.K. (1998). Nucleoprotein architecture and *ColE1* dimer resolution: a hypothesis. *Mol. Microbiol.* 29, 545–558.

Ingmer, H., Miller, C., and Cohen, S.N. (2001). The RepA protein of plasmid pSC101 controls *Escherichia coli* cell division through the SOS response. *Mol. Microbiol.* 42, 519–526.

Ip, S.C.Y., Bregu, M., Barre, F.-X., and Sherratt, D.J. (2003). Decatenation of DNA circles by FtsK-dependent Xer site-specific recombination. *EMBO J.* 22, 6399–6407.

James, A.A., Morrison, P.T., and Kolodner, R. (1982). Genetic recombination of bacterial plasmid DNA. *J. Mol. Biol.* 160, 411–430.

Jha, J.K., Ghirlando, R., and Chattoraj, D.K. (2014). Initiator protein dimerization plays a key role in replication control of *Vibrio cholerae* chromosome 2. *Nucleic Acids Res.* 42, 10538–10549.

Johnson, T.J., Wannemeuhler, Y.M., Scaccianoce, J.A., Johnson, S.J., and Nolan, L.K. (2006). Complete DNA sequence, comparative genomics, and prevalence of an IncHI2 plasmid occurring among extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3929–3933.

Kono, N., Arakawa, K., and Tomita, M. (2011). Comprehensive prediction of chromosome dimer resolution sites in bacterial genomes. *BMC Genomics* 12, 19.

Kowalczykowski, S.C., Dixon, D.A., Eggleston, A.K., Lauder, S.D., and Rehrauer, W.M. (1994). Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 58, 401–465.

Kubasova, T., Cejkova, D., Matiasovicova, J., Sekelova, Z., Polansky, O., Medvecký, M., Rychlík, I., and Juricova, H. (2016). Antibiotic Resistance, Core-Genome and Protein Expression in IncHI1 Plasmids in *Salmonella Typhimurium*. *Genome Biol. Evol.* 8, 1661–1671.

Lawley, T.D., and Taylor, D.E. (2003). Characterization of the double-partitioning modules of R27: correlating plasmid stability with plasmid localization. *J. Bacteriol.* 185, 3060–3067.

Le Bourgeois, P., Bugarel, M., Campo, N., Daveran-Mingot, M.-L., Labonté, J., Lanfranchi, D., Lautier, T., Pagès, C., and Ritzenthaler, P. (2007). The unconventional Xer recombination machinery of *Streptococci*/*Lactococci*. *PLoS Genet.* 3, e117.

Lee, L., and Sadowski, P.D. (2003a). Sequence of the loxP site determines the order of strand exchange by the Cre recombinase. *J. Mol. Biol.* 326, 397–412.

Lee, L., and Sadowski, P.D. (2003b). Identification of Cre residues involved in synapsis, isomerization, and catalysis. *J. Biol. Chem.* 278, 36905–36915.

Lee, J.Y., Finkelstein, I.J., Arciszewska, L.K., Sherratt, D.J., and Greene, E.C. (2014). Single-molecule imaging of FtsK translocation reveals mechanistic features of protein-protein collisions on DNA. *Mol. Cell* 54, 832–843.

Lenhart, J.S., Schroeder, J.W., Walsh, B.W., and Simmons, L.A. (2012). DNA repair and genome maintenance in *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 76, 530–564.

Lesterlin, C., Barre, F.-X., and Cornet, F. (2004). Genetic recombination and the cell cycle: what we have learned from chromosome dimers. *Mol. Microbiol.* 54, 1151–1160.

Levy, O., Ptacin, J.L., Pease, P.J., Gore, J., Eisen, M.B., Bustamante, C., and Cozzarelli, N.R. (2005). Identification of oligonucleotide sequences that direct the movement of the *Escherichia coli* FtsK translocase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 17618–17623.

Löwe, J., Ellonen, A., Allen, M.D., Atkinson, C., Sherratt, D.J., and Grainge, I. (2008). Molecular mechanism of sequence-directed DNA loading and translocation by FtsK. *Mol. Cell* 31, 498–509.

Marchetti, M., Capela, D., Glew, M., Cruveiller, S., Chane-Woon-Ming, B., Gris, C., Timmers, T., Poinot, V., Gilbert, L.B., Heeb, P., et al. (2010). Experimental evolution of a plant pathogen into a legume symbiont. *PLoS Biol.* 8, e1000280.

Marini, J.C., Effron, P.N., Goodman, T.C., Singleton, C.K., Wells, R.D., Wartell, R.M., and Englund, P.T. (1984). Physical characterization of a kinetoplast DNA fragment with unusual properties. *J. Biol. Chem.* 259, 8974–8979.

May, P.F.J., Zawadzki, P., Sherratt, D.J., Kapanidis, A.N., and Arciszewska, L.K. (2015). Assembly, translocation, and activation of XerCD-dif recombination by FtsK translocase analyzed in real-time by FRET and two-color tethered fluorophore motion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E5133–E5141.

Midonet, C., and Barre, F.-X. (2014). Xer Site-Specific Recombination: Promoting Vertical and Horizontal Transmission of Genetic Information. *Microbiol. Spectr.* 2.

Midonet, C., Das, B., Paly, E., and Barre, F.-X. (2014). XerD-mediated FtsK-independent integration of TLC ϕ into the *Vibrio cholerae* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 16848–16853.

Mirza, S., Kariuki, S., Mamun, K.Z., Beeching, N.J., and Hart, C.A. (2000). Analysis of plasmid and chromosomal DNA of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar typhi from Asia. *J. Clin. Microbiol.* *38*, 1449–1452.

Newnham, P.J., and Taylor, D.E. (1994). Molecular analysis of RepHI1A, a minimal replicon of the IncHI1 plasmid R27. *Mol. Microbiol.* *11*, 757–768.

Nolivos, S., Pages, C., Rousseau, P., Le Bourgeois, P., and Cornet, F. (2010). Are two better than one? Analysis of an FtsK/Xer recombination system that uses a single recombinase. *Nucleic Acids Res.* *38*, 6477–6489.

Nolivos, S., Touzain, F., Pages, C., Coddeville, M., Rousseau, P., El Karoui, M., Le Bourgeois, P., and Cornet, F. (2012). Co-evolution of segregation guide DNA motifs and the FtsK translocase in bacteria: identification of the atypical *Lactococcus lactis* KOPS motif. *Nucleic Acids Res.* *40*, 5535–5545.

Pachulec, E., Siewering, K., Bender, T., Heller, E.-M., Salgado-Pabon, W., Schmoller, S.K., Woodhams, K.L., Dillard, J.P., and van der Does, C. (2014). Functional Analysis of the Gonococcal Genetic Island of *Neisseria gonorrhoeae*. *PLoS ONE* *9*, e109613.

Page, D.T., Whelan, K.F., and Colleran, E. (2001). Characterization of two autoreplicative regions of the IncHI2 plasmid R478: RepHI2A and RepHI1A((R478)). *Microbiol. Read. Engl.* *147*, 1591–1598.

Parkhill, J., Dougan, G., James, K.D., Thomson, N.R., Pickard, D., Wain, J., Churcher, C., Mungall, K.L., Bentley, S.D., Holden, M.T., et al. (2001). Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi CT18. *Nature* *413*, 848–852.

Patient, M.E., and Summers, D.K. (1993). ColE1 multimer formation triggers inhibition of *Escherichia coli* cell division. *Mol. Microbiol.* *9*, 1089–1095.

Pérals, K., Cornet, F., Merlet, Y., Delon, I., and Louarn, J.M. (2000). Functional polarization of the *Escherichia coli* chromosome terminus: the dif site acts in chromosome dimer resolution only when located between long stretches of opposite polarity. *Mol. Microbiol.* *36*, 33–43.

Pinkney, J.N.M., Zawadzki, P., Mazuryk, J., Arciszewska, L.K., Sherratt, D.J., and Kapanidis, A.N. (2012). Capturing reaction paths and intermediates in Cre-loxP recombination using single-molecule fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 20871–20876.

Pinto, U.M., Pappas, K.M., and Winans, S.C. (2012). The ABCs of plasmid replication and segregation. *Nat. Rev. Microbiol.* *10*, 755–765.

Plénat, T., Tardin, C., Rousseau, P., and Salomé, L. (2012). High-throughput single-molecule analysis of DNA-protein interactions by tethered particle motion. *Nucleic Acids Res.* *40*, e89.

Poulter, R.T.M., and Butler, M.I. (2015). Tyrosine Recombinase Retrotransposons and Transposons. *Microbiol. Spectr.* *3*, MDNA3–MDNA0036 – 2014.

Ptacin, J.L., Nöllmann, M., Bustamante, C., and Cozzarelli, N.R. (2006). Identification of the FtsK sequence-recognition domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13, 1023–1025.

Rajeev, L., Malanowska, K., and Gardner, J.F. (2009). Challenging a paradigm: the role of DNA homology in tyrosine recombinase reactions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* 73, 300–309.

Ramsey, M.E., Woodhams, K.L., and Dillard, J.P. (2011). The Gonococcal Genetic Island and Type IV Secretion in the Pathogenic *Neisseria*. *Front. Microbiol.* 2.

Ramsey, M.E., Bender, T., Klimowicz, A.K., Hackett, K.T., Yamamoto, A., Jolicoeur, A., Callaghan, M.M., Wassarman, K.M., van der Does, C., and Dillard, J.P. (2015). Targeted mutagenesis of intergenic regions in the *Neisseria gonorrhoeae* gonococcal genetic island reveals multiple regulatory mechanisms controlling type IV secretion: Expression and regulation of the gonococcal T4SS genes. *Mol. Microbiol.* 97, 1168–1185.

Recchia, G.D., and Sherratt, D.J. (1999). Conservation of xer site-specific recombination genes in bacteria. *Mol. Microbiol.* 34, 1146–1148.

Reijns, M., Lu, Y., Leach, S., and Colloms, S.D. (2005). Mutagenesis of PepA suggests a new model for the Xer/cer synaptic complex. *Mol. Microbiol.* 57, 927–941.

Rice, P.A. (2015). Serine Resolvases. *Microbiol. Spectr.* 3, MDNA3–MDNA0045 – 2014.

Rzechorzek, N.J., Blackwood, J.K., Bray, S.M., Maman, J.D., Pellegrini, L., and Robinson, N.P. (2014). Structure of the hexameric HerA ATPase reveals a mechanism of translocation-coupled DNA-end processing in archaea. *Nat. Commun.* 5, 5506.

Sanchez, A., Cattoni, D.I., Walter, J.-C., Rech, J., Parmeggiani, A., Nollmann, M., and Bouet, J.-Y. (2015). Stochastic Self-Assembly of ParB Proteins Builds the Bacterial DNA Segregation Apparatus. *Cell Syst.* 1, 163–173.

Saul, D., Lane, D., and Bergquist, P.L. (1988). A replication region of the IncHI plasmid, R27, is highly homologous with the RepFIA replicon of F. *Mol. Microbiol.* 2, 219–225.

Serre, M.-C., El Arnaout, T., Brooks, M.A., Durand, D., Lisboa, J., Lazar, N., Raynal, B., van Tilbeurgh, H., and Quevillon-Cheruel, S. (2013). The carboxy-terminal α N helix of the archaeal XerA tyrosine recombinase is a molecular switch to control site-specific recombination. *PloS One* 8, e63010.

Sharpe, M.E., Chatwin, H.M., Macpherson, C., Withers, H.L., and Summers, D.K. (1999). Analysis of the ColE1 stability determinant Rcd. *Microbiol. Read. Engl.* 145 (Pt 8), 2135–2144.

Sherburne, C.K., Lawley, T.D., Gilmour, M.W., Blattner, F.R., Burland, V., Grotbeck, E., Rose, D.J., and Taylor, D.E. (2000). The complete DNA sequence and analysis of R27, a large IncHI plasmid from *Salmonella typhi* that is temperature sensitive for transfer. *Nucleic Acids Res.* 28, 2177–2186.

Slater, S.C., Goldman, B.S., Goodner, B., Setubal, J.C., Farrand, S.K., Nester, E.W., Burr, T.J., Banta, L., Dickerman, A.W., Paulsen, I., et al. (2009). Genome sequences of three agrobacterium biovars help elucidate the evolution of multichromosome genomes in bacteria. *J. Bacteriol.* *191*, 2501–2511.

Snyder, L.A., Davies, J.K., and Saunders, N.J. (2004). Microarray genomotyping of key experimental strains of *Neisseria gonorrhoeae* reveals gene complement diversity and five new neisserial genes associated with Minimal Mobile Elements. *BMC Genomics* *5*, 23.

Snyder, L.A.S., Jarvis, S.A., and Saunders, N.J. (2005). Complete and variant forms of the “gonococcal genetic island” in *Neisseria meningitidis*. *Microbiol. Read. Engl.* *151*, 4005–4013.

Steiner, W.W., and Kuempel, P.L. (1998). Cell division is required for resolution of dimer chromosomes at the *dif* locus of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *27*, 257–268.

Stirling, C.J., Szatmari, G., Stewart, G., Smith, M.C., and Sherratt, D.J. (1988). The arginine repressor is essential for plasmid-stabilizing site-specific recombination at the *ColE1* *cer* locus. *EMBO J.* *7*, 4389–4395.

Stirling, C.J., Colloms, S.D., Collins, J.F., Szatmari, G., and Sherratt, D.J. (1989). *xerB*, an *Escherichia coli* gene required for plasmid *ColE1* site-specific recombination, is identical to *pepA*, encoding aminopeptidase A, a protein with substantial similarity to bovine lens leucine aminopeptidase. *EMBO J.* *8*, 1623–1627.

Stouf, M., Meile, J.-C., and Cornet, F. (2013). *FtsK* actively segregates sister chromosomes in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 11157–11162.

Sträter, N., Sherratt, D.J., and Colloms, S.D. (1999). X-ray structure of aminopeptidase A from *Escherichia coli* and a model for the nucleoprotein complex in *Xer* site-specific recombination. *EMBO J.* *18*, 4513–4522.

Subramanya, H.S., Arciszewska, L.K., Baker, R.A., Bird, L.E., Sherratt, D.J., and Wigley, D.B. (1997). Crystal structure of the site-specific recombinase, *XerD*. *EMBO J.* *16*, 5178–5187.

Summers, D.K., and Sherratt, D.J. (1984). Multimerization of high copy number plasmids causes instability: *ColE1* encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell* *36*, 1097–1103.

Summers, D.K., Beton, C.W., and Withers, H.L. (1993). Multicopy plasmid instability: the dimer catastrophe hypothesis. *Mol. Microbiol.* *8*, 1031–1038.

Thiel, A., Valens, M., Vallet-Gely, I., Espéli, O., and Boccard, F. (2012). Long-range chromosome organization in *E. coli*: a site-specific system isolates the *Ter* macrodomain. *PLoS Genet.* *8*, e1002672.

de Toro, M., Garcilláon-Barcia, M.P., and De La Cruz, F. (2014). Plasmid Diversity and

Adaptation Analyzed by Massive Sequencing of *Escherichia coli* Plasmids. *Microbiol. Spectr.* 2.

Touzain, F., Petit, M.-A., Schbath, S., and El Karoui, M. (2011). DNA motifs that sculpt the bacterial chromosome. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 15–26.

Val, M.-E., Kennedy, S.P., El Karoui, M., Bonné, L., Chevalier, F., and Barre, F.-X. (2008). FtsK-dependent dimer resolution on multiple chromosomes in the pathogen *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet.* 4, e1000201.

Val, M.-E., Soler-Bistué, A., Bland, M.J., and Mazel, D. (2014a). Management of multipartite genomes: the *Vibrio cholerae* model. *Curr. Opin. Microbiol.* 22, 120–126.

Val, M.-E., Kennedy, S.P., Soler-Bistué, A.J., Barbe, V., Bouchier, C., Ducos-Galand, M., Skovgaard, O., and Mazel, D. (2014b). Fuse or die: how to survive the loss of Dam in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 91, 665–678.

Val, M.-E., Marbouty, M., de Lemos Martins, F., Kennedy, S.P., Kemble, H., Bland, M.J., Possoz, C., Koszul, R., Skovgaard, O., and Mazel, D. (2016). A checkpoint control orchestrates the replication of the two chromosomes of *Vibrio cholerae*. *Sci. Adv.* 2, e1501914.

Van Duyne, G.D. (2001). A structural view of cre-loxp site-specific recombination. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30, 87–104.

Wain, J., Diem Nga, L.T., Kidgell, C., James, K., Fortune, S., Song Diep, T., Ali, T., O Gaora, P., Parry, C., Parkhill, J., et al. (2003). Molecular analysis of incHI1 antimicrobial resistance plasmids from *Salmonella* serovar Typhi strains associated with typhoid fever. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2732–2739.

Wood, M.M., and Gardner, J.F. (2015). The Integration and Excision of CTnDOT. *Microbiol. Spectr.* 3, MDNA3–MDNA0020 – 2014.

Woodhams, K.L., Benet, Z.L., Blonsky, S.E., Hackett, K.T., and Dillard, J.P. (2012). Prevalence and Detailed Mapping of the Gonococcal Genetic Island in *Neisseria meningitidis*. *J. Bacteriol.* 194, 2275–2285.

Zweig, M., Schork, S., Koerdt, A., Siewering, K., Sternberg, C., Thormann, K., Albers, S.-V., Molin, S., and van der Does, C. (2014). Secreted single-stranded DNA is involved in the initial phase of biofilm formation by *Neisseria gonorrhoeae*. *Environ. Microbiol.* 16, 1040–1052.

ANNEXE 1: Resolution of Multimeric Forme of Circular Plasmids and Chromosomes

Resolution of Multimeric Forms of Circular Plasmids and Chromosomes

ESTELLE CROZAT,¹ FLORIAN FOURNES,¹ FRANÇOIS CORNET,²
BERNARD HALLET,³ and PHILIPPE ROUSSEAU¹

¹Université de Toulouse, UPS, Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires, F-31062 Toulouse, France; ²CNRS, Laboratoire de Microbiologie et Génétique Moléculaires, F-31062 Toulouse, France; ³Institut des Sciences de la Vie, UCLouvain, 4/5 L7.07.06 Place Croix du Sud, B-1348 Louvain-la-Neuve, Belgium

ABSTRACT One of the disadvantages of circular plasmids and chromosomes is their high sensitivity to rearrangements caused by homologous recombination. Odd numbers of crossing-over occurring during or after replication of a circular replicon result in the formation of a dimeric molecule in which the two copies of the replicon are fused. If they are not converted back to monomers, the dimers of replicons may fail to correctly segregate at the time of cell division. Resolution of multimeric forms of circular plasmids and chromosomes is mediated by site-specific recombination, and the enzymes that catalyze this type of reaction fall into two families of proteins: the serine and tyrosine recombinase families. Here we give an overview of the variety of site-specific resolution systems found on circular plasmids and chromosomes.

One of the serious disadvantages of circular plasmids and chromosomes is their high sensitivity to rearrangements caused by homologous recombination. Odd numbers of recombinational exchanges occurring during or after replication of a circular replicon result in the formation of a dimeric molecule in which the two copies of the replicon are fused in a head-to-tail configuration ([Fig. 1](#)). If they are not converted back to monomers, the dimers of replicons may fail to correctly segregate at the time of cell division.

Resolution of multimeric forms of circular plasmids and chromosomes is mediated by site-specific recombination, an efficient and tightly controlled DNA breakage and joining reaction that occurs at specific DNA sequences

([Fig. 1A](#)). Site-specific recombinases, the enzymes that catalyze this type of reaction, fall into two families of proteins: the serine and tyrosine recombinase families ([1](#)).

This chapter, which is an update of a previous version ([2](#)), provides an overview of the variety of site-specific resolution systems found on circular plasmids and chromosomes. After an introduction about the formation and the incidence of replicon multimers, we present the two families of resolution systems, based on serine or tyrosine recombinases. The most recent advances in understanding of the molecular mechanisms that control the recombination reactions catalyzed by these systems will be discussed. These illustrate how different molecular actors have evolved to achieve the same function but also how some are devoted to plasmid dispersion, whereas some are devoted to chromosome or to mobile genetic element dispersion.

Received: 6 June 2014, **Accepted:** 13 June 2014,
Published: 24 October 2014

Editors: Marcelo Tolmasky, California State University, Fullerton, CA, and Juan Carlos Alonso, Centro Nacional de Biotecnología, Cantoblanco, Madrid, Spain

Citation: Crozat E, Fournes F, Cornet F, Hallet B, Rousseau P. 2014. Resolution of multimeric forms of circular plasmids and chromosomes. *Microbiol Spectrum* 2(5):PLAS-0025-2014. doi:10.1128/microbiolspec.PLAS-0025-2014.

Correspondence: Philippe Rousseau, philippe.rousseau@ibcg.biotoul.fr

© 2014 American Society for Microbiology. All rights reserved.

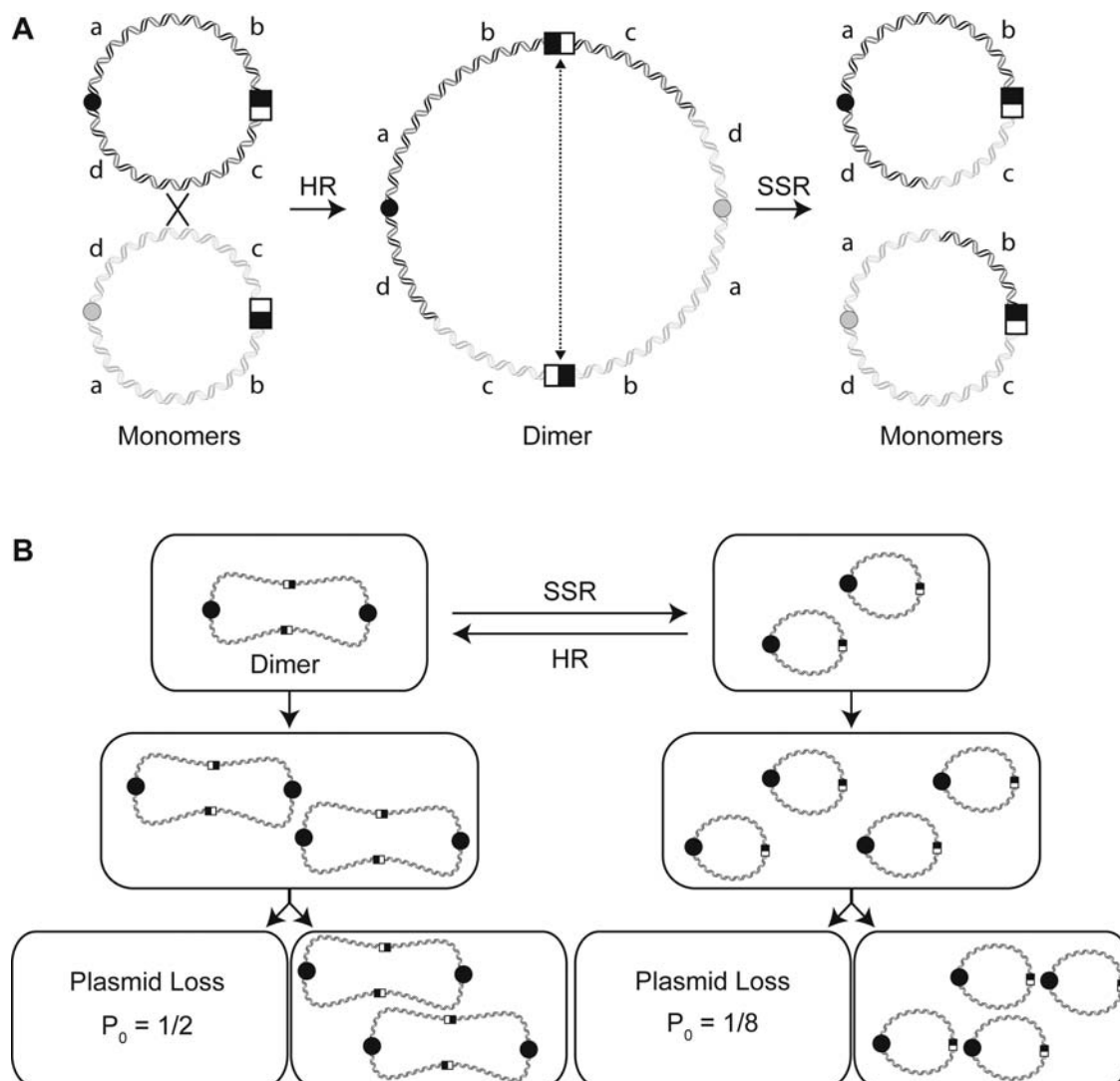


FIGURE 1 Formation of plasmid dimers and their stability in the cell. (A) Dimers of plasmids or chromosomes are formed by homologous recombination (HR) during replication and are later resolved by site-specific recombination (SSR). Origins are shown by a circle, and site-specific recombination sites by a black and white square. (B) The accumulation of plasmid dimers in the cell leads to an increase in plasmid loss compared to monomeric plasmids. [doi:10.1128/microbiolspec.PLAS-0025-2014.f1](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0025-2014.f1)

FORMATION AND INCIDENCE OF PLASMID MULTIMERS

Multimerization of circular DNA molecules is largely due to homologous recombination. Studies of high-copy-number plasmids, such as pBR322, revealed that multimerization primarily occurs by RecF-dependent recombination (3). RecBCD activity on double-strand ends would lead to rapid degradation and inefficient recombination of small DNA molecules. To our knowledge, similar studies have not been performed on large low-copy-number plasmids, although these plasmids

harbor multimer resolution systems whose inactivation causes a defect in plasmid stability.

The net result of homologous recombination between sister plasmids is the production of multimers (Fig. 1A). However, the formation of multimers may have different effects depending on the mode of replication and partition of the replicon. Unresolved chromosome dimers are certainly lethal in most cases and are broken in a desperate effort of resolution due to the so-called guillotine effect. Plasmid multimers affect plasmid stability by lowering the number of independently segregating units

at the time of cell division. They may also interfere with the control of replication and with the activity of the plasmid segregation system. High-copy-number plasmids segregate randomly so that the probability of generating plasmid-free cells is inversely proportional to their copy number at division time (4, 5) (Fig. 1B). Replication of these plasmids is controlled by origin counting, which means that a dimer counts as two plasmids for replication but only as a single unit for segregation. Thus, the formation of multimers lowers the number of freely segregating DNA molecules per origin, thereby raising the frequency of plasmid loss (4, 6, 7) (Fig. 1B). In addition, replication of high-copy-number plasmids follows a random copy choice mode so that a dimer replicates twice as frequently as a monomer. This replicative advantage of multimers causes their rapid accumulation in the progeny of the cells in which they appeared. This phenomenon, called the dimer catastrophe, is responsible for the largest part of the segregation defect due to plasmid multimerization since it leads to the formation of a subpopulation of cells that mostly contain multimers (4, 6, 7).

Although they are likely to have adverse effects on partition systems, multimers of actively partitioned replicons such as F or P1 have complex and poorly understood effects since the stability of these plasmids does not solely depend on the number of independently segregating units at cell division (for review see reference 8).

DNA SITE-SPECIFIC RECOMBINATION: THE GOOD RESOLUTION OF PLASMIDS AND CHROMOSOMES

Conservative DNA site-specific recombination is a carefully orchestrated reaction during which four DNA strands are broken, exchanged, and resealed to equivalent positions of separate sequences (see below). This is mediated by relatively simple molecular machines in which specialized enzymes, termed site-specific recombinases, catalyze the essential DNA breakage and joining reactions. The recombination reaction can lead to the integration, excision, or inversion of a DNA fragment, depending on the relative positioning of the recombination sites. However, recombination between directly repeated sites on a circular DNA molecule leads to deletion of the intervening DNA segment.

Besides its role in the stable inheritance of circular plasmids and chromosomes, site-specific recombination is exploited in a range of programmed DNA rearrangements in bacteria including integration and excision of temperate bacteriophages into and out of

the genome of their host, the movement of different classes of mobile genetic elements (e.g., transposons, integrons, insertion sequences, and integrating conjugative elements [ICE]), the variable expression of virulence genes in pathogens (by means of simple or combinatorial DNA inversion switches), and the control of developmentally regulated genes (9–13).

Recombinases that mediate these different rearrangements, including dimer resolution, are often termed resolvases, integrases, transposases, or DNA invertases to designate the type of reaction they catalyze. These enzymes fall into two major families of unrelated proteins using different mechanisms to cleave and rejoin DNA molecules. These two groups of enzymes are now commonly referred to as the serine recombinase family and the tyrosine recombinase family according to the conserved residue that provides the primary nucleophile in the DNA cleavage reaction (1). Recombinases of both families mediate recombination at the level of short (~30 base pairs) DNA segments termed the core or crossover site onto which two recombinase molecules bind, usually by recognizing specific sequences with dyad symmetry. The recombinase recognition motifs are separated by a central region at the borders of which the DNA strands are cut and exchanged by the protein (see below and Figs. 2 and 3). With a few exceptions that will be outlined below, this minimal core site is usually insufficient to mediate recombination. The recombination sites of most characterized systems have a more complex organization, with additional binding sites for accessory proteins. These accessory sequences and proteins are used to control the recombination reaction, allowing recombination systems to achieve their biological function without generating undesirable and potentially deleterious DNA rearrangements. For plasmid and chromosome resolution systems this control is important to convert multimers to monomers and not vice versa.

Plasmid Resolution Systems of the Serine Recombinase Family

Recombinases belonging to the serine recombinase family are present on a number of plasmids from both Gram-negative and Gram-positive bacteria, but only a few of them have been shown to contribute to plasmid maintenance by converting multimers into monomers. Here, we report several characterized plasmid resolution systems of the serine recombinase family, most of them being clearly derived, during recent evolution, from the $\gamma\delta$ and Tn3 resolvases from replicative transposons (for review see references 14 and 15).

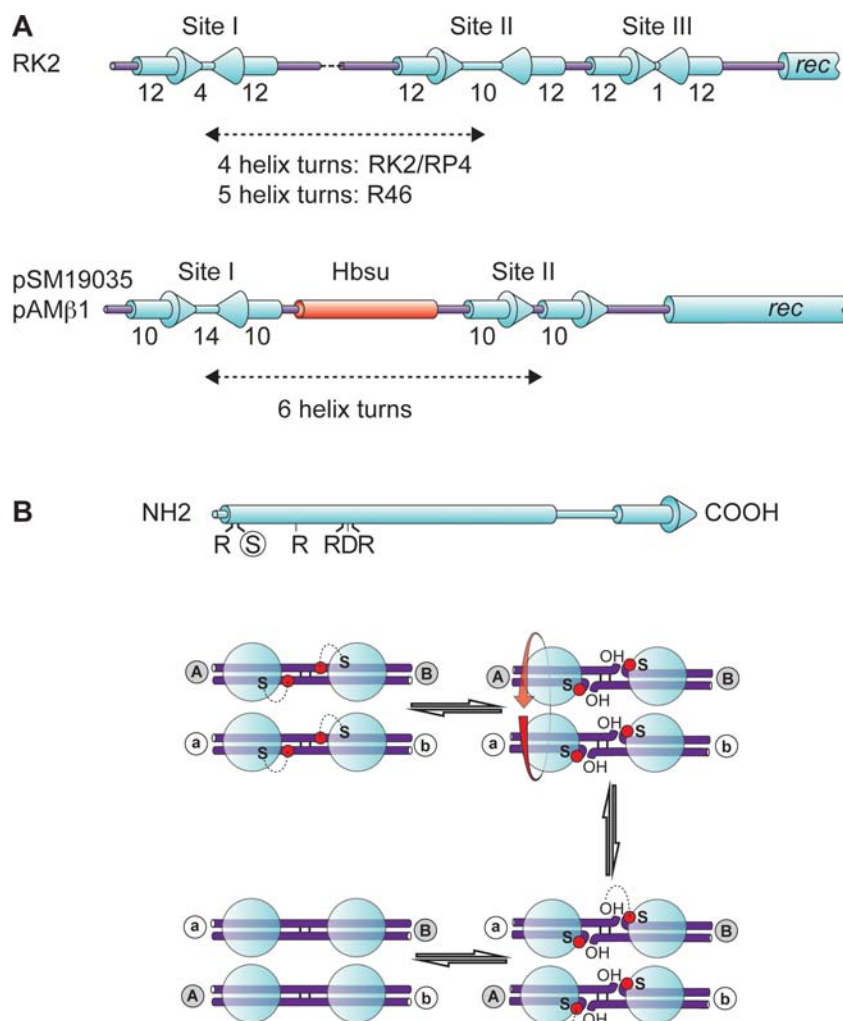


FIGURE 2 Site-specific recombination by serine recombinases. (A) Structure of the recombination sites of Tn3 and $\gamma\delta$ recombinases (top) and the β recombinase and Sin family (bottom). Sequences are shown with arrows, and their length is (bp) indicated nearby. The genes coding for the recombinases are located downstream (*rec*). Hbsu (red) depicts a binding site for the accessory protein. (B) The primary structure of a typical serine recombinase (top), showing the catalytic serine in a circle; other amino acids implicated in catalysis are also indicated (bottom). The scheme depicts the four principal steps of recombination by serine recombinase: four recombinases bind on their sites and form the synapse; the four strands are cut and bound covalently to the catalytic serines (red dot), which is followed by a 180° rotation of two of the subunits and rejoining of the DNA strands. [doi:10.1128/microbiolspec.PLAS-0025-2014.f2](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0025-2014.f2)

Genetic organization of serine recombinase-catalyzed resolution systems

RK2/RP4 resolution systems:

Tn3 and $\gamma\delta$ recombinases

An example of an integrated plasmid resolution system is provided by the ParA/res system of the IncP-1 α plasmid RK2 (identical to RP4) (15, 17). Plasmids of this family have a relatively low copy number (between five and eight copies per chromosome) and can be stably propagated in a wide range of Gram-negative bacteria (17). Important determinants of this stability are encoded in the 3.2-kb *par* locus of the plasmid. This locus is comprised of two divergently transcribed operons (*parCBA* and *parDE*), separated by a short intergenic region of about 180 bp. The *parDE* operon encodes a post-segregational killing system (toxin-antitoxin system) homologous to those found in other plasmids and in the chromosome of various bacterial species (19, 20).

In addition to the serine recombinase ParA, the *parCBA* operon encodes two other proteins that have no apparent role in site-specific recombination. This region also contains the recombination site at which the ParA recombinase acts to resolve plasmid multimers (15, 20, 21). This site, designated RK2 *res*, has an organization similar to that of many Tn3-family transposon *res* sites, with three inverted repeats being bound by the recombinase (17) (Fig. 2A).

The ParA/res recombination system significantly contributes to the segregational stability of the RK2 plasmid, but recombination was insufficient to account for this contribution. Resolution of dimers may thus not be the only function of the ParA/res system (21). In addition, its replacement by another multimer resolution system (i.e., the *Escherichia coli* Xer/cer system or the bacteriophage P1 Cre/loxP system; see below) only partially complements the defects in plasmid stability (22).

Together, these observations suggest that the plasmid resolution function of the *Par/res* system forms a part of a more complex stabilization process involving additional host- and/or plasmid-encoded factors.

pSM19035 and pAM β 1 resolution system: β recombinase and Sin

Large theta-replicating plasmids of Gram-positive bacteria encode different subfamilies of serine recombinases, which together form the β recombinase family. This family is a group of relatively well-conserved proteins that are present on broad-host-range plasmids. The best-studied members of this family are the β protein of the *Streptococcus pyogenes* plasmid pSM19035 and the pAM β 1 Res β recombinase from *Enterococcus faecalis* (for review see reference 23). These proteins are ~40% identical to Sin, the prototype of a second group of highly homologous recombinases found on large staphylococcal plasmids (2, 24, 25). Sin and the β recombinases have been characterized at a genetic and biochemical level. The recombination target site of these recombinases exhibits a similar two-subsite structure, with the protein recognizing inverted repeats at the crossover site I and direct repeats at the accessory site II (26, 27) (Fig. 2A). *In vitro* studies have shown that recombination by Sin and the β recombinases also requires the nucleoid-associated protein Hbsu or any equivalent nonspecific DNA-bending protein, such as HU from *E. coli* or the HMG proteins from eukaryotes (27, 28). This protein plays an architectural role in the formation of the synaptic complex by inducing substantial DNA bends in the recombining partners (see below) (27).

Mechanism of serine recombinase-catalyzed resolution: concerted double-strand breaks and rotational exchange of the recombination half-sites

Serine recombinases are characterized by the presence of a relatively well-conserved catalytic domain of about 120 amino acid residues. This domain contains the catalytic serine and several other conserved residues clustered into specific motifs (Fig. 2B). Some of these residues are part of the active site pocket, whereas others are involved in protein-protein interactions between separate recombinase molecules in the recombination complex (29–32).

Although functional and structural diversity among serine recombinases is likely to reflect important variations in the molecular organization of the recombination

complex, all the family members are thought to mediate recombination by using the same strand exchange mechanism (27, 30) (Fig. 2B). Recombination by serine recombinase is a concerted process in which all four DNA strands of the two recombination sites are cut, exchanged, and then rejoined in the recombinant configuration (for review see reference 1). The reaction starts when the active serine of each of the four recombinase molecules in the complex attacks the phosphodiester bond adjacent to its binding site. Cleavage of each duplex is staggered by two base pairs, generating protruding 3'-OH overhangs and recessed 5' ends to which the recombinase is attached through a covalent phosphoseryl bond. Catalysis of these reactions is highly coordinated, and the complex in which the four cleaved half-sites are solely held together by protein-DNA and protein-protein interactions is an obligate intermediate in the recombination pathway (33–35). Topological changes occurring during recombination mediated by serine recombinase are consistent with the DNA strands being exchanged by a simple 180° right-handed rotation of one pair of cleaved ends relative to the other. In this mechanism, the extended two bases that are exchanged between the two duplexes must be complementary to allow base pairing between rejoining ends. Thus, the two base-pair overlap regions define the polarity of the recombination site (Fig. 2B).

Crystallographic studies on the resolvase of $\gamma\delta$, together with the biochemical characterization of specific recombinase mutants, have provided important insights on the molecular organization of serine recombinases and the protein-protein and protein-DNA interactions within the recombination complex supporting a detailed molecular model for the 180° rotation (36–39). The arrangement of the active site residues in the resolvase dimer is consistent with the previous finding that the recombinase cleaves the DNA in *cis*, by acting at the nearest position from its binding site (33). In this model, the strand exchange is coupled to a rotational rearrangement of the DNA-linked recombinase subunits within the tetramer (39). This mechanism requires that the dimer interface that holds the cleaved half-sites in the complex is transiently disrupted during the dissociation/reassociation process. To make this possible, a flat and hydrophobic interface is created within the tetramer, which permits the rotation of the synapsed subunits relative to each other (29, 39). This class of mechanism is supported by data suggesting that the DNA strands are at the outside of the synaptic complex and are thus too far apart to be exchanged without involving substantial motions of the proteins (30, 37). However,

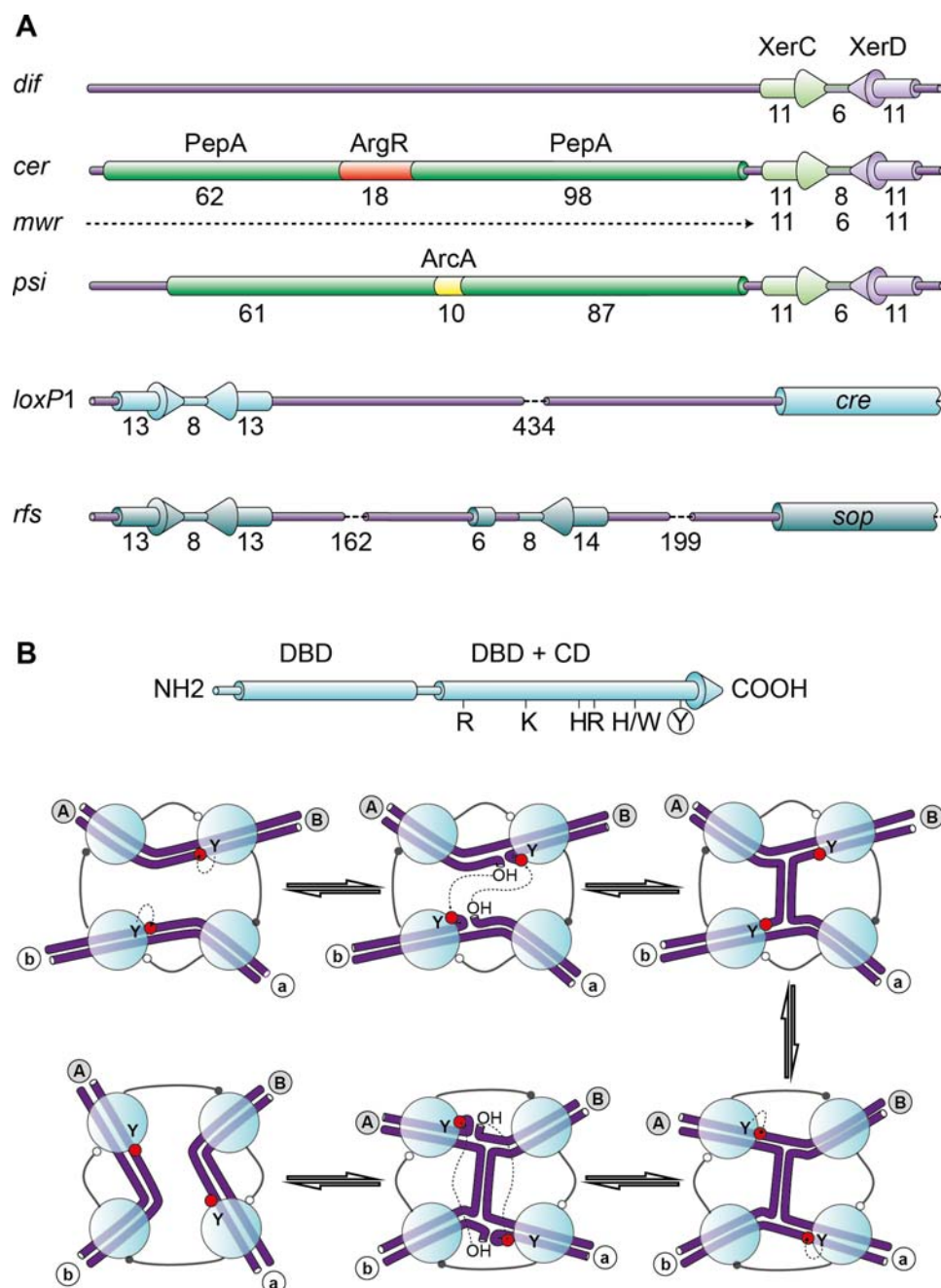


FIGURE 3 Site-specific recombination by tyrosine recombinases. (A) Structure of principal recombination sites from tyrosine recombinase family. Symbols are the same as in Fig. 2. (B) The primary structure of a typical tyrosine recombinase (top), showing the catalytic tyrosine in a circle; other amino-acids implicated in catalysis are also indicated. Two distinct protein domains are shown: the DNA binding domain (DBD) and another DNA binding domain containing the catalytic domain (DBD + CD) (bottom). The scheme depicts the principal steps of recombination by tyrosine recombinase: four recombinases bind on their sites and form the synapse; cleavage occurs first on only two DNA strands, catalyzed by one active pair of recombinases in the tetramer (XerC or XerD in the case of *dif*, *cer*, *mwr*, and *psi*). A transient Holliday junction is formed after a first strand exchange and is isomerized to allow the cleavage of the two other strands by the other pair of recombinases. The second strand exchange takes place, and the complex dissociates. [doi:10.1128/microbiolspec.PLAS-0025-2014.f3](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0025-2014.f3)

based on homology between serine recombinases and topoisomerases, an alternative model, without subunit rotation, has been recently proposed and is still under debate (40).

Plasmid Resolution Systems of the Tyrosine Recombinase Family

Genetic organization of tyrosine recombinase-catalyzed resolution systems

Site-specific resolution systems that function with a tyrosine recombinase exhibit variable levels of complexity. Large conjugative plasmids and replicative prophages generally encode their own recombinase adjacent to the recombination site, allowing them to be transferred with a fully functional resolution system among different bacteria. In contrast, small plasmids, such as those of the ColE1 family, utilize the chromosome dimer resolution system of their host. The recombination site of these different systems may be limited to a simple crossover sequence, as in the bacteriophage P1 *Cre/loxP* system, or may be more complex, containing additional DNA binding sites for regulatory proteins (Fig. 3A).

Xer: a universal and multipurpose recombination system for the resolution of replicon dimers

Xer recombination provides a good example illustrating how relatively simply DNA site-specific recombination mechanisms can be adapted to accomplish different biological functions. The Xer recombinase is unusual in that it functions as a heterotetramer comprising two proteins of the tyrosine recombinase family, XerC and XerD (41, 42). Homologues of these two proteins are found in the genome of virtually all bacteria and archaea harboring circular chromosomes, consistent with Xer recombination having an important and conserved function in chromosome segregation (43–46). The *xerC* and *xerD* genes are generally found in separate regions of the genome where they are sometimes associated with other genes involved in DNA repair and recombination (47). They were first demonstrated to increase the stability of naturally occurring multicopy plasmids, such as ColE1, by converting multimers into monomers (5, 48). This function was shown to require the presence of a specific site termed *cer* in ColE1. Related recombination sites were subsequently identified in a number of *E. coli* plasmids (49), as well as in pSC101 (*psi*) from *Salmonella typhimurium* (50) and pJHCMW1 (*mur*) from *Klebsiella pneumoniae* (51, 52). It was later found that the primary function of the Xer system is to resolve dimers of the chromosome by acting at the *dif* site,

located in the replication terminus region of the *E. coli* chromosome (see below) (53–55).

The different target sites for Xer recombination share a conserved ~30-bp core sequence containing 11-bp XerC and XerD recognition motifs separated by a central region of 6 to 8 bp (53, 56). In addition to XerC and XerD, recombination at plasmid resolution sites depends on additional host-encoded proteins and on the presence of ~160 to 180 bp of accessory sequences adjacent to the core (Fig. 3A). Interactions between the accessory sequences and proteins are important to control the outcome of recombination, ensuring that it will convert plasmid multimers to monomers and not the converse (see below and Fig. 4) (for a recent review see reference 57). A special section is devoted to the XerCD-*dif* chromosome dimer resolution (see below and Fig. 5).

Individual resolution systems:

Cre/loxP of P1 and *ResD/rfs* of F

The *Cre/loxP* recombination system of *E. coli* bacteriophage P1 was discovered for its role in the circularization of the infecting phage genome by performing a recombination reaction between the terminally redundant P1 DNA ends (58–60). The recombination system was subsequently shown to contribute to the proper segregation of the prophage (61). In P1 derivatives lacking either the *loxP* site or a functional *cre* gene, products were lost 20 to 40 times more frequently than in the wild-type lysogenic form of the phage at each generation. This segregational defect disappeared when plasmids were propagated in a RecA⁻ strain, indicating that it resulted from the formation of dimers and higher multimeric forms by homologous recombination. This finding provided the first demonstration that site-specific recombination can be used to counteract damaging effects caused by homologous recombination on circular replicons (61).

The Cre recombinase is distantly related to the integrase Int of bacteriophage λ, the archetype of the tyrosine recombinase family. This is consistent with biochemical data showing that both proteins use the same mechanism to cut and rejoin DNA molecules (for reviews see references 1, 62). The *loxP* site, which is located 434 bp upstream of the *cre* gene, has the minimal structure of a recombination core site, with two inversely oriented 13-bp recombinase-binding motifs flanking an asymmetrical sequence of 8 bp (Fig. 3A). Both *in vivo* and *in vitro* studies have demonstrated that this 34-bp *loxP* sequence is a sufficient substrate for Cre (63, 64). In addition, in contrast to most recombinases,

Cre shows no strong preference for a particular arrangement of the recombination sites (direct repeat sites lead to deletion of the intervening DNA, whereas inverted repeat sites lead to its inversion) and has little requirement regarding the topology of the DNA, at least *in vitro* (65, 66). The reaction works equally well on supercoiled, relaxed, or linear DNA molecules, generating all possible intra- and intermolecular recombination products. This apparent lack of selectivity is consistent with the fact that the Cre/loxP system is required to mediate functionally distinct DNA rearrangements at separate stages of P1 development. The relative simplicity of this system has also greatly facilitated biochemical and structural studies aiming at elucidating the molecular recombination mechanism of tyrosine recombinases (for recent reviews see references 1, 62).

The ResD/*rfs* resolution system of the *E. coli* F factor is much less well described. It is encoded within the RepFIA replication region of the plasmid. The recombinase gene, *resD*, is cotranscribed with *ccdB* and *ccdA*, the toxin and antitoxin of the plasmid postsegregational killing system (19). The RepFIA region also contains the *sopAB* operon that encodes the centromere-like partitioning system of F (67). The target site for ResD is the *rfs* locus located upstream of the *ccd* operon, in a DNA segment that overlaps with the *oriV1* replication origin of F. The fully functional resolution site of F is ill defined, but it seems to have a more complex organization than that described for Cre (Fig. 3A). Deletion analysis showed that recombination requires additional DNA sequences extending up to 200 bp away from the *rfs* crossover site. ResD was found to protect two discrete regions in this sequence, although binding to the core inverted repeats was undetectable (68, 69).

Multimer resolution systems, which are closely related to the F plasmid ResD/*rfsF* system, have been shown to contribute to the stable inheritance of other conjugative plasmids, but very little is known about them (2).

Mechanism of tyrosine recombinase-catalyzed resolution

Tyrosine recombinases differ widely in amino acid sequence. However, the ternary structure of the catalytic domain is remarkably conserved among different members of the family (70–75). The catalytic signature of the family is composed of six residues, RKHRH/WY, which are clustered in specific regions of the C-terminal catalytic domain of the proteins (Fig. 3B) (1, 76).

The crystal structures of protein-DNA complexes reported for Cre and Flp, together with biochemical

studies of different recombination systems, have given conclusive information on how the recombination complex is organized and how it works (Fig. 3B) (1). The assembly of the synapse is crucial for the regulation of the reaction (see below and references 65, 66) within this complex; the two recombination sites are aligned in an antiparallel conformation, and the DNA is bent in a roughly square planar configuration. It has been proposed that the DNA is bent in such a way that only one pair of recombinases is ready to cut DNA. Indeed, DNA bending “hides” two of the four scissile phosphate groups, one in each DNA duplex, allowing nucleophilic attack by catalytic tyrosine residues on the two other scissile phosphates (Fig. 3B; red circles). This creates a 3'-phosphotyrosyl covalent link between the DNA and the protein and liberates a 5'-OH end at the cleaved strand. DNA strands are then exchanged by melting three or four nucleotides from the parental duplexes before re-annealing them to the complementary bases in the partner (Fig. 3B). Watson-Crick base-pairing between the cleaved and uncleaved DNA strands tests the homology between the two recombination sites and helps to orient the invading 5'-OH ends for ligation (77). This ligation is the result of the nucleophilic attack on the 3' phosphotyrosyl group by the partner 5'-OH end after strand exchange and forms a first Holliday junction intermediate (HJ1). HJ1 isomerizes into a second Holliday junction intermediate, HJ2, within which the second pair of recombinases is activated (66, 78–80). The resolution of HJ2 into the recombination product is performed via a second cycle of cleavage, strand exchange, and ligation reactions (Fig. 3B) (for a more detailed description see reference 1).

The choice of the first active pair of recombinases is crucial for the control of the reaction. It is thought that this choice is made during the assembly of the synapse (66, 81). Within the Cre-*loxP* synapse, the four recombinase molecules forming the tetramer are held together by a cyclic network of protein-protein interactions involving both the C and N-terminal domains of the protein. This cyclical donor-acceptor interaction between Cre monomers connects the four recombinase active sites in the tetramer, providing a means of communication between them (71, 72). Deviation from the perfect 4-fold symmetry in the Cre-DNA complexes provides a simple model for the isomerization mechanism that leads to sequential activation (and reciprocal inactivation) of pairs of recombinase subunits during a complete recombination reaction. In this mechanism, which is also true for other tyrosine recombinases such as λ int, small readjustments of the angles formed by the arms of the

Holliday junction, coupled with little conformational changes in the C-terminal donor-acceptor interaction, suffice to explain the reciprocal activation/inactivation between pairs of recombinases (65, 66). Accordingly, in the case of Cre, this isomerization step recently appeared to be very rapid (79, 80, 82).

For XerCD-*dif* recombination, the synapse contains two units of XerC and two units of XerD, and the two pairs, XerC or XerD, are active sequentially (81, 83–85). In this case the model for the isomerization mechanism is supported by experiments showing that alteration of the recombinase C-terminus affects catalysis by the partner recombinase (84, 86).

A remarkably similar organization of the recombination complex is observed for Flp, although the N-terminal domains have totally different structures (87). A fundamental difference between Cre and Flp lies in the nature of the allosteric interactions that regulate the recombinase activity. In the Flp-DNA structures, the α -helix carrying the tyrosine nucleophile of one monomer is donated to the active site of an adjacent monomer of the complex. This active site sharing mechanism of Flp and the allosteric donor-acceptor interaction proposed for Cre and other cis-acting recombinases represent alternative, but functionally equivalent, strategies for coordinating catalysis in the recombination complex.

SYNAPTOSOME AND TOPOLOGY

Convergent Mechanisms To Impose Resolution Selectivity on the Recombination Reaction

As mentioned above, for most site-specific recombination systems, the minimal core site at which the cognate recombinase acts to catalyze the strand exchange reaction is usually insufficient to carry out normal recombination at a normal frequency. The target sites of these systems contain additional accessory sequences to which further recombinase molecules or other auxiliary proteins bind, thereby forming part of the functional recombination complex. Formation of this complex may be needed to facilitate the pairing of the core sites and/or to activate the recombinase catalytic activity within the tetramer. The specific architecture of the recombination complex provides a means of controlling the reaction, ensuring that recombination will only occur at the correct time or between appropriately positioned recombination sites. It is crucial for the biological function of site-specific resolution systems to selectively carry out recombination between directly repeated copies of the recombination site in order to prevent the formation

of multimers and to avoid other undesirable DNA rearrangements. In these systems, discrimination between different arrangements of the recombination sites is achieved by imposing a specific local DNA geometry within the synaptic complex. Requirements for this complex act as a topological filter because it cannot readily assemble if the two recombination sites are in a wrong configuration or on separate DNA molecules. The recombination products of these systems are characterized by a single topology that is dictated both by the topology of the initial synapse and by the strand exchange mechanism used by the recombinases (for a comprehensive discussion on the mechanisms of topological selectivity, see reference 57).

A Common Synapse Architecture for Resolvases of the Serine Recombinase Family

The mechanism of topological selectivity was first established for the resolution systems of replicative transposons belonging to the Tn3 family (88). The resolvase is the only protein required to resolve cointegrates *in vitro*. Recombination only takes place if two complete copies of the transposon resolution *res* sites are present in an appropriate head-to-tail orientation on the same supercoiled DNA molecule. The major products of the reaction are two molecules interlinked twice (four-node catenane). This observation, combined with a number of biochemical and topological data from different laboratories, led to the conclusion that resolvase binding to the three subsites of *res* results in the formation of a specific synaptic complex, termed the synaptosome, in which the two recombination sites are interwrapped in a structure trapping three negative supercoils from the initial DNA substrate (Fig. 4). Assembly of this complex is a stepwise process that initiates with the antiparallel pairing of the accessory sites II and III of the two *res* sites. DNA wrapping around the resolvase accessory subunits acts as a checkpoint (i.e., topological filter) that dictates whether the reaction can proceed further by correctly positioning the subsite I-bound resolvase subunits for the strand exchange reaction (36, 88).

In the most recent model for the Tn3 synaptosome, the recombination sites are wrapped around a pair of interlocked protein filaments comprised of six resolvase dimers, each dimer being bound to a different *res* subsite (36) (Fig. 4). The site III-bound dimer forms the central unit of each filament, making equivalent contacts with its two neighbors. An important implication of this model is that the crossover sites lie at the outside of the protein core formed by the recombinase catalytic

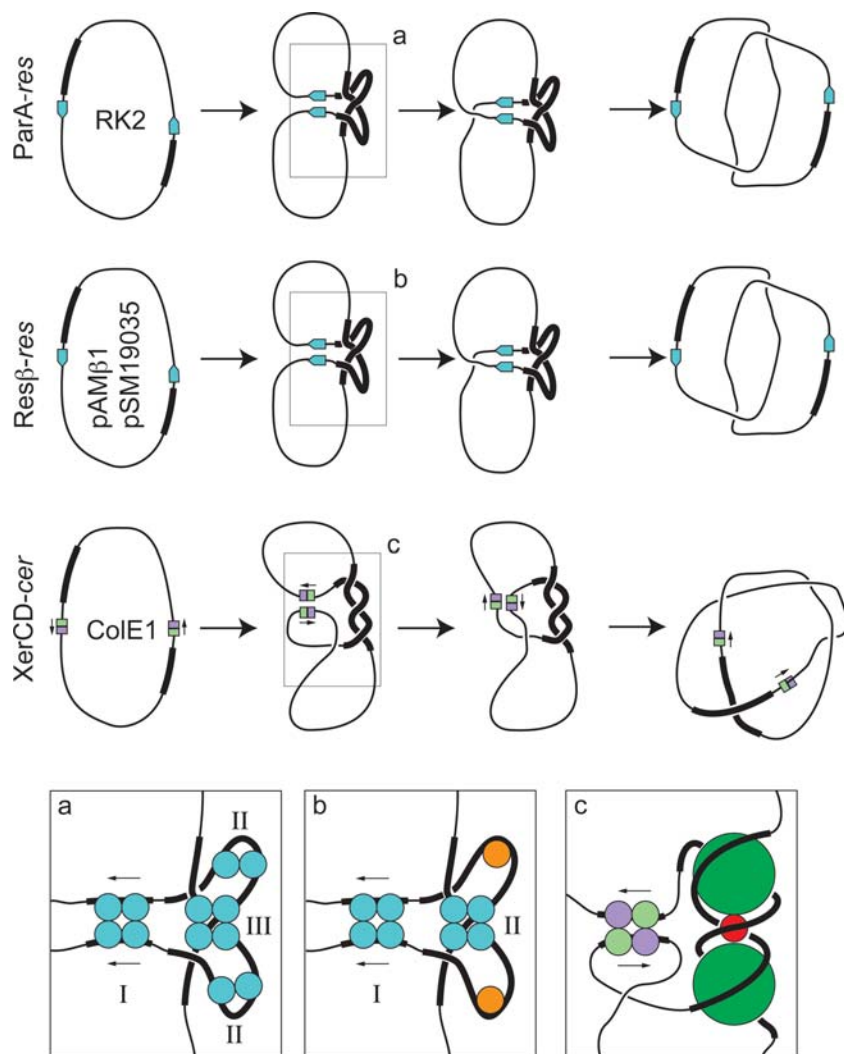


FIGURE 4 Topology of various recombinational synapses. Examples of synapses formed during recombination by two main families of serine recombinase (a, b) and one of tyrosine recombinase (c) are shown. Main recombination sites are colored (blue and green/purple), and the accessory sequences are shown as a thick line. The precise configuration of the synapses are drawn below, with (a, b) serine recombinase in blue, Hbsu in orange, (c) XerC and Xer in green and purple, PepA in dark green, and ArgR in red. [doi:10.1128/microbiolspec.PLAS-0025-2014.f4](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0025-2014.f4)

domains, which is consistent with the view that there must be substantial structural rearrangements within the complex to carry out strand exchange.

The topology of the recombination reaction catalyzed by other resolvases of the serine recombinase family, such as the ParA protein of RP4/RK2 (17), the Sin recombinase of *S. aureus* (31, 89) and the β recombinase of pSM19035 (90) (Fig. 4), was found to be the same as that reported for the cointegrate resolution system of Tn3 and $\gamma\delta$, generating four-node catenane products. Consistently, a similar overall architecture of the synaptic complex has been proposed for the plasmid resolvases Sin and β (31, 35, 37, 90). This arrangement thus represents a common structural unit in the synaptic complex of different resolution systems. Hbsu plays an important role in the formation of the complex by stabilizing the DNA bends between the two regions that are bound by the recombinase (Fig. 4). Note that in the case

of the β recombinase, alternative configurations of the synapse were proposed to account for its ability to mediate DNA inversion under certain circumstances (90).

Topological Selectivity in Xer Recombination of the Tyrosine Recombinase Family

To satisfy its dual role in chromosome and plasmid segregation, the Xer system has evolved separate mechanisms to control recombination at the chromosomal site *dif*, or at plasmid resolution sites such as *cer* and *psi* (for review see reference 13). In the case of *cer* and *psi*, binding of the accessory proteins (i.e., PepA and ArgR, and PepA and ArcA, respectively) to the recombination site accessory sequences promotes the assembly of a topologically defined synaptic complex in which, as in the resolvase synaptosome, three negative DNA supercoils are trapped (Fig. 4). A fourth node is introduced

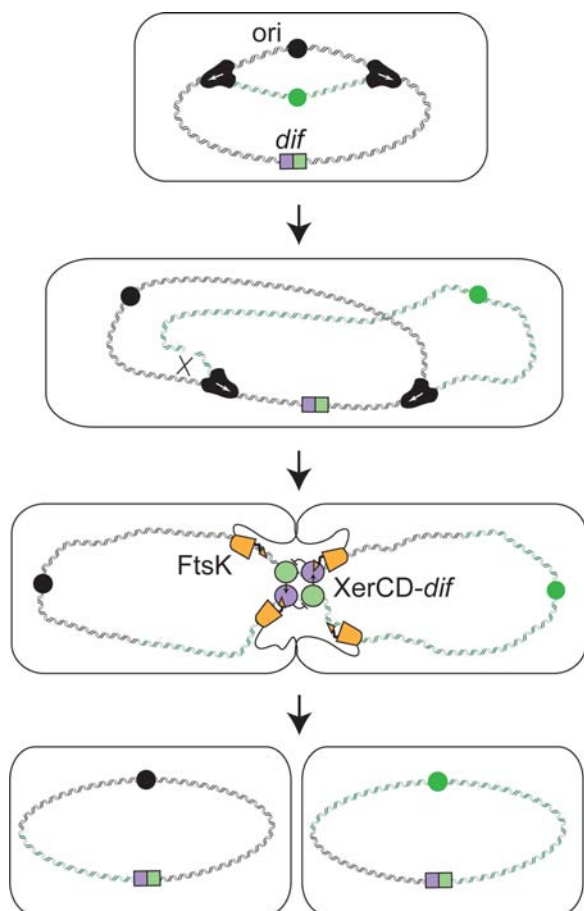


FIGURE 5 Resolution of chromosome dimers. During chromosome replication, single- or double-strand breaks appear that necessitate homologous recombination to be repaired. This leads to the formation of dimers of chromosomes, which are resolved by XerC (green) and XerD (purple) after the activation of XerD by FtsK (orange), localized at the septum. Cell division can then take place and maintain two integrate copies of the chromosome. Origins of replication are represented as green and black dots, replication forks as black complexes with white arrows indicating replication direction, and the *dif* site as a green and purple square. [doi:10.1128/microbiolspec.PLAS-0025-2014.f5](https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0025-2014.f5)

to align the recombination core sites in an antiparallel configuration. Consequently, recombination between directly repeated *psi* sites produces a four-noded catenane (Fig. 4). Recombination at *cer* follows the same pathway but stops after the first strand exchange, generating a catenated Holliday junction-containing molecule that is resolved to products by a Xer-independent mechanism *in vivo* (for review see reference 57).

Based on genetic, structural, and topological data, a model of the *cer* synaptic complex was proposed (Fig. 4) (91–93). In this model, one ArgR hexamer is sandwiched between two PepA hexamers, and the recombination

sites wrap around the accessory proteins as a right-handed superhelix. The ArgR hexamer bridges the two recombination sites by binding to the ArgR box from either partner, whereas PepA specifies the topology of the complex by directing the DNA across three large grooves running from the lower face to the upper face of the hexamer. Recombination at *psi* is thought to occur within a similar synaptic structure, in which an oligomer of ArcA would take the place of ArgR (57). Formation of the synaptic complex at *psi* was found to position the recombinases in a specific configuration so as to activate the XerC protomers for the first strand exchange reaction (94).

A similar topological filter mechanism was more recently found to control the recombination reaction catalyzed by the tyrosine recombinase TnpI from the Tn3-family transposon Tn4430, providing another example of convergent strategies to mediate selectivity in plasmid multimers and transposition cointegrate resolution systems (95, 96). However, in the case of the Tn4430 resolution system, additional subunits of the TnpI protein itself provide the architectural regulatory elements of the recombination complex without requiring any other host- or transposon-encoded proteins. In addition, recombination by TnpI produces two-noded catenane products instead of four-noded catenanes as observed for Xer, indicating that the topological organization of the recombination complexes differ between the two systems (95, 96).

RESOLUTION OF CHROMOSOME DIMERS

E. coli Model

The best-studied case of multimer formation is dimerization of circular chromosomes, and most of the work has been done in *E. coli*. Ten to fifteen percent of the chromosomes require Xer recombination for correct segregation (97, 98). This requirement is suppressed in a RecA-deficient strain, consistent with the view that the vast majority of chromosome dimers form by homologous recombination (97). It is generally admitted that most recombination events are a consequence of recombinational repair of stalled, broken, or collapsed replication forks. Collapse or processing of stalled forks creates DNA ends that need recombination to be resealed with the circular molecule, allowing replication to restart (99–101). In the case of an odd number of these events, this leads to the formation of a dimer of chromosomes. It is believed that unresolved dimers are trapped by the cell septum at division, leading to chromosome breakage by an unknown mechanism (100).

To avoid random cutting of its chromosome, *E. coli* uses the tyrosine recombinases XerC and XerD, but with a different control than for plasmid dimer resolution. The recombination site, called *dif*, possesses the same characteristics as a plasmid core recombination site (Figs. 3A and 5), with oppositely oriented XerC and XerD recognition elements separated by a 6-bp central region (Fig. 3A). However, the mechanism that controls recombination at the chromosome site *dif* and the plasmid resolution sites differs significantly. There is no need for accessory sequences around *dif*. Instead, the reaction is under the control of the DNA-translocase FtsK. This ATP-dependent translocase is anchored at the septum through its N-terminal transmembrane domain, which interacts with the early proteins of the divisome. This restricts FtsK action to a specific cellular location, the septum, and a short period of time following replication (97, 98, 102). Septal localization of FtsK is also important to recruit late divisome proteins that are required for septum completion and closure (103). Analogues of FtsK are found in almost all bacteria sequenced so far (104). The main ones studied are SpoIIIE and SftA from *Bacillus* (105, 106), but their role in site-specific recombination is still unclear (107). Recombination activation involves direct and specific interactions between the very C-terminal domain of FtsK, called the γ -domain, and XerD bound to *dif* (Fig. 5) (108–110). When activated, XerD cuts and exchanges the first pair of strands, and the resulting Holliday junction intermediate is then resolved by XerC.

Finding two *dif* sites within a dimer of chromosomes might not be an easy task for FtsK. In addition to interacting with XerD, the γ -domain of FtsK also recognizes 8-bp oriented sequences on DNA, called KOPS (for FtsK oriented polar sequences), which point toward the *dif* site (105, 111). FtsK recognizes these sequences in an oriented manner, and therefore translocates toward the direction of *dif* (112, 113). During its high-speed translocation (up to 17 kb/s), FtsK removes any protein bound to DNA (114, 115). It only stops when it reaches a *dif*-XerCD complex, but it is still unclear whether FtsK contributes to synapse assembly by recruiting another XerCD-*dif* complex or whether the synapse is already formed at this point (81, 85, 114).

It has been long questioned whether the translocase activity of FtsK could play a more general role in chromosome segregation, since the presence of the C-terminal motor does not appear to be essential for proper cell division (103). Recent results have shown that FtsK does indeed participate in chromosome segregation, by ordering segregation of the terminal domain (116),

independently of the monomeric or dimeric state of the replicated chromosomes. Therefore, FtsK ensures that the last genetic locus to remain at the septum is *dif*, since the KOPS converge at this site.

Another remaining question concerns the ability of the FtsK/XerCD system to resolve dimers by generating only free products (not catenated). Experiments done on plasmids containing two *dif* sites show that the γ -domain of FtsK (free or linked to XerC or XerD) is sufficient to activate recombination. However, such reactions lead to products with complex topologies (catenated or knotted). These topologically complex products never arise when the reaction is carried out with a full-length FtsK motor (110). FtsK thus either prevents the formation of interlinked products before activating recombination and/or resolves them by further rounds of recombination. This latter hypothesis has been demonstrated *in vitro* and *in vivo* (117, 118).

Multichromosomal Bacteria

The only experimental work on multichromosomal bacteria has been done with *Vibrio cholerae*, which has two chromosomes (119) but only one XerC, XerD, and FtsK. This work revealed that chromosome dimer resolution in *V. cholerae* followed the same mechanism as in *E. coli*. The key point is the difference in the sequences of the two *dif* sites carried by the two chromosomes. The XerD binding motifs of both sites are conserved from other bacterial species, as are most of the XerC ones. The main difference lies in the central region: the central region of *dif1* is highly conserved with respect to the *dif* site of other bacteria, whereas the central region of *dif2* is much more divergent. This is also the case for most of the multichromosomal bacteria. A plausible explanation for this observation is selective pressure to avoid recombinational fusion between two, nonhomologous, chromosomes (43, 44). Despite this, chromosome fusions appear to happen sporadically within populations of *V. cholerae* (120), suggesting that this mechanism is not totally error-proof.

Alternative, Single-Recombinase Xer Systems in Bacteria

Despite the broad conservation of the XerCD system in bacteria, some bacteria have acquired another system that functions with a single recombinase. Examples include the firmicutes *Lactococci* and *Streptococci* and some of the ϵ -proteobacteria such as *Helicobacter* spp. and *Campylobacter* spp. The XerS/*dif*_{SL} and XerH/*dif*_H systems acting in the two groups of bacteria (121, 122) function on the same principle as XerCD/*dif*. However,

protomers of the same recombinase bind the two arms of the *dif* sites, and the control imposed by FtsK seems to be looser than that described for canonical systems involving two different recombinases (122–124).

Resolution of Dimers in Archaea

Despite their eukaryotic-type machineries for replication and DNA repair, archaea also possess a Xer/*dif* recombination system to maintain their circular chromosomes. A survey covering about 20 archaeal genomes suggested that archaea possess only one Xer protein, later named XerA (45, 125). The XerA proteins from *Pyrococcus abyssi* and *Sulfolobus solfataricus* have been characterized biochemically (45, 46). Both display recombination activity on their respective *dif* sites without the help of any accessory protein, which is unusual for Xer-type proteins but is consistent with the lack of a FtsK homologue in archaea. It is therefore unclear yet how archaea couple the end of replication with cell division.

DIMER RESOLUTION AND HORIZONTAL GENE TRANSFER

Beyond their demonstrated role in the maintenance of genetic information, site-specific resolution systems have been found to be involved in horizontal gene transfer. As mentioned earlier, Tn3-family transposable elements use a replicative transposition mechanism, which generates a cointegrate structure made of the fusion of the donor and target DNA molecules. Resolution of this cointegrate by intramolecular-site-specific recombination between the two copies of the element regenerates the initial donor molecule and releases a copy of the target into which the transposon is inserted. For most Tn3-family transposons the recombination reaction is catalyzed by a serine recombinase, while in the case of Tn4430 and a few other elements, resolution of the cointegrates is mediated by a tyrosine recombinase (2, 96, 126).

More recently, integrative mobile elements exploiting Xer recombination systems (13) have been described to hijack the chromosomal XerCD-*dif* dimer resolution system. First discovered for their involvement in toxic conversion in *V. cholerae* (127), it appears that integration/excision of these mobile genetic elements depends on XerC and/or XerD (128–130).

ACKNOWLEDGMENT

Conflict of interest: We disclose no conflicts.

REFERENCES

1. Grindley NDF, Whiteson KL, Rice PA. 2006. Mechanisms of site-specific recombination. *Annu Rev Genet* 75:567–605.

2. Hallet B, Vanhooft V, Cornet F. 2004. DNA site-specific resolution systems, p 145–178. In Funnel BE, Phillips GJ (ed), *Plasmid Biology*. ASM Press, Washington, DC.
3. James AA, Morrison PT, Kolodner R. 1982. Genetic recombination of bacterial plasmid DNA. Analysis of the effect of recombination-deficient mutations on plasmid recombination. *J Mol Biol* 160:411–430.
4. Summers DK, Beton CW, Withers HL. 1993. Multicopy plasmid instability: the dimer catastrophe hypothesis. *Mol Microbiol* 8:1031–1038.
5. Summers DK, Sherratt DJ. 1984. Multimerization of high copy number plasmids causes instability: ColE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell* 36:1097–1103.
6. Hodgman TC, Griffiths H, Summers DK. 1998. Nucleoprotein architecture and ColE1 dimer resolution: a hypothesis. *Mol Microbiol* 29:545–558.
7. Field CM, Summers DK. 2011. Multicopy plasmid stability: revisiting the dimer catastrophe. *J Theor Biol* 291:119–127.
8. Salje J. 2010. Plasmid segregation: how to survive as an extra piece of DNA. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45:296–317.
9. Hallet B. 2001. Playing Dr Jekyll and Mr Hyde: combined mechanisms of phase variation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 4:570–581.
10. Cambray G, Guerout A-M, Mazel D. 2010. Integrins. *Annu Rev Genet* 44:141–166.
11. Wisniewski-Dyé F, Vial L. 2008. Phase and antigenic variation mediated by genome modifications. *Antonie Van Leeuwenhoek* 94:493–515.
12. Wozniak RAF, Waldor MK. 2010. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat Rev Microbiol* 8:552–563.
13. Das B, Martínez E, Midonet C, Barre F-X. 2013. Integrative mobile elements exploiting Xer recombination. *Trends Microbiol* 21:23–30.
14. Cortez D, Quevillon-Cheruel S, Gribaldo S, Desnoves N, Sezonov G, Forterre P, Serre M-C. 2010. Evidence for a Xer/*dif* system for chromosome resolution in archaea. *PLoS Genet* 6:e1001166.
15. Curcio MJ, Derbyshire KM. 2003. The outs and ins of transposition: from mu to kangaroo. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:865–877.
16. Deleted in proof.
17. Eberl L, Kristensen CS, Givskov M, Grohmann E, Gerlitz M, Schwab H. 1994. Analysis of the multimer resolution system encoded by the parCBA operon of broad-host-range plasmid RP4. *Mol Microbiol* 12:131–141.
18. Deleted in proof.
19. Gerdes K. 2000. Toxin-antitoxin modules may regulate synthesis of macromolecules during nutritional stress. *J Bacteriol* 182:561–572.
20. Roberts RC, Ström AR, Helinski DR. 1994. The parDE operon of the broad-host-range plasmid RK2 specifies growth inhibition associated with plasmid loss. *J Mol Biol* 237:35–51.
21. Sobecky PA, Easter CL, Bear PD, Helinski DR. 1996. Characterization of the stable maintenance properties of the par region of broad-host-range plasmid RK2. *J Bacteriol* 178:2086–2093.
22. Easter CL, Sobecky PA, Helinski DR. 1997. Contribution of different segments of the par region to stable maintenance of the broad-host-range plasmid RK2. *J Bacteriol* 179:6472–6479.
23. Liroy VS, Pratto F, la Hoz de AB, Ayora S, Alonso JC. 2010. Plasmid pSM19035, a model to study stable maintenance in *Firmicutes*. *Plasmid* 64:1–17.
24. Paulsen IT, Gillespie MT, Littlejohn TG, Hanvivatvong O, Rowland SJ, Dyke KG, Skurray RA. 1994. Characterisation of sin, a potential recombinase-encoding gene from *Staphylococcus aureus*. *Gene* 141:109–114.
25. Smith MCM, Thorpe HM. 2002. Diversity in the serine recombinases. *Mol Microbiol* 44:299–307.

26. Rojo F, Alonso JC. 1995. The beta recombinase of plasmid pSM19035 binds to two adjacent sites, making different contacts at each of them. *Nucleic Acids Res* 23:3181–3188.
27. Mouw KW, Steiner AM, Ghirlando R, Li N-S, Rowland S-J, Boocock MR, Stark WM, Piccirilli JA, Rice PA. 2010. Sin resolvase catalytic activity and oligomerization state are tightly coupled. *J Mol Biol* 404:16–33.
28. Stemmer C, Fernández S, López G, Alonso JC, Grasser KD. 2002. Plant chromosomal HMGB proteins efficiently promote the bacterial site-specific beta-mediated recombination *in vitro* and *in vivo*. *Biochemistry* 41:7763–7770.
29. Burke ME, Arnold PH, He J, Wenwieser SVCT, Rowland S-J, Boocock MR, Stark WM. 2004. Activating mutations of Tn3 resolvase marking interfaces important in recombination catalysis and its regulation. *Mol Microbiol* 51:937–948.
30. Sarkis GJ, Murley LL, Leschziner AE, Boocock MR, Stark WM, Grindley ND. 2001. A model for the gamma delta resolvase synaptic complex. *Mol Cell* 8:623–631.
31. Rowland S-J, Stark WM, Boocock MR. 2002. Sin recombinase from *Staphylococcus aureus*: synaptic complex architecture and transposon targeting. *Mol Microbiol* 44:607–619.
32. Yang W, Steitz TA. 1995. Crystal structure of the site-specific recombinase gamma delta resolvase complexed with a 34 bp cleavage site. *Cell* 82:193–207.
33. Boocock MR, Zhu X, Grindley ND. 1995. Catalytic residues of gamma delta resolvase act in cis. *EMBO J* 14:5129–5140.
34. Merickel SK, Haykinson MJ, Johnson RC. 1998. Communication between Hin recombinase and Fis regulatory subunits during coordinate activation of Hin-catalyzed site-specific DNA inversion. *Genes Dev* 12:2803–2816.
35. Mouw KW, Rowland S-J, Gajjar MM, Boocock MR, Stark WM, Rice PA. 2008. Architecture of a serine recombinase-DNA regulatory complex. *Mol Cell* 30:145–155.
36. Rice PA, Mouw KW, Montañó SP, Boocock MR, Rowland S-J, Stark WM. 2010. Orchestrating serine resolvases. *Biochem Soc Trans* 38:384–387.
37. Keenholz RA, Rowland S-J, Boocock MR, Stark WM, Rice PA. 2011. Structural basis for catalytic activation of a serine recombinase. *Structure* 19:799–809.
38. Dhar G, Heiss JK, Johnson RC. 2009. Mechanical constraints on Hin subunit rotation imposed by the Fis/enhancer system and DNA supercoiling during site-specific recombination. *Mol Cell* 34:746–759.
39. Li W, Kamtekar S, Xiong Y, Sarkis GJ, Grindley NDF, Steitz TA. 2005. Structure of a synaptic gammadelta resolvase tetramer covalently linked to two cleaved DNAs. *Science* 309:1210–1215.
40. Yang W. 2010. Topoisomerases and site-specific recombinases: similarities in structure and mechanism. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45:520–534.
41. Colloms SD, Sykora P, Szatmari G, Sherratt DJ. 1990. Recombination at ColE1 cer requires the *Escherichia coli* xerC gene product, a member of the lambda integrase family of site-specific recombinases. *J Bacteriol* 172:6973–6980.
42. Blakely G, May G, McCulloch R, Arciszewska LK, Burke M, Lovett ST, Sherratt DJ. 1993. Two related recombinases are required for site-specific recombination at dif and cer in *E. coli* K12. *Cell* 75:351–361.
43. Kono N, Arakawa K, Tomita M. 2011. Comprehensive prediction of chromosome dimer resolution sites in bacterial genomes. *BMC Genomics* 12:19.
44. Carnoy C, Roten C-A. 2009. The dif/Xer recombination systems in proteobacteria. *PLoS One* 4:e6531.
45. Cortez D, Quevillon-Cheruel S, Gribaldo S, Desnoves N, Sezonov G, Forterre P, Serre M-C. 2010. Evidence for a Xer/dif system for chromosome resolution in archaea. *PLoS Genet* 6:e1001166.
46. Duggin IG, Dubarry N, Bell SD. 2011. Replication termination and chromosome dimer resolution in the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *EMBO J* 30:145–153.
47. Recchia GD, Sherratt DJ. 1999. Conservation of xer site-specific recombination genes in bacteria. *Mol Microbiol* 34:1146–1148.
48. Hakkaart MJ, van den Elzen PJ, Velkamp E, Nijkamp HJ. 1984. Maintenance of multicopy plasmid Clo DF13 in *E. coli* cells: evidence for site-specific recombination at parB. *Cell* 36:203–209.
49. Hiraga S, Sugiyama T, Itoh T. 1994. Comparative analysis of the replicon regions of eleven ColE2-related plasmids. *J Bacteriol* 176:7233–7243.
50. Cornet F, Mortier I, Patte J, Louarn JM. 1994. Plasmid pSC101 harbors a recombination site, psi, which is able to resolve plasmid multimers and to substitute for the analogous chromosomal *Escherichia coli* site dif. *J Bacteriol* 176:3188–3195.
51. Tolmasky ME, Colloms S, Blakely G, Sherratt DJ. 2000. Stability by multimer resolution of pJHCMW1 is due to the Tn1331 resolvase and not to the *Escherichia coli* Xer system. *Microbiology* 146(Pt 3):581–589.
52. Pham H, Dery KJ, Sherratt DJ, Tolmasky ME. 2002. Osmoregulation of dimer resolution at the plasmid pJHCMW1 mwr locus by *Escherichia coli* XerCD recombination. *J Bacteriol* 184:1607–1616.
53. Blakely G, Colloms S, May G, Burke M, Sherratt D. 1991. *Escherichia coli* XerC recombinase is required for chromosomal segregation at cell division. *New Biol* 3:789–798.
54. Clerget M. 1991. Site-specific recombination promoted by a short DNA segment of plasmid R1 and by a homologous segment in the terminus region of the *Escherichia coli* chromosome. *New Biol* 3:780–788.
55. Kuempel PL, Henson JM, Dircks L, Tecklenburg M, Lim DF. 1991. dif, a recA-independent recombination site in the terminus region of the chromosome of *Escherichia coli*. *New Biol* 3:799–811.
56. Hayes F, Sherratt DJ. 1997. Recombinase binding specificity at the chromosome dimer resolution site dif of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 266:525–537.
57. Colloms SD. 2013. The topology of plasmid-monomerizing Xer site-specific recombination. *Biochem Soc Trans* 41:589–594.
58. Sternberg N, Hamilton D, Austin S, Yarmolinsky M, Hoess R. 1981. Site-specific recombination and its role in the life cycle of bacteriophage P1. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 45(Pt 1):297–309.
59. Segev N, Cohen G. 1981. Control of circularization of bacteriophage P1 DNA in *Escherichia coli*. *Virology* 114:333–342.
60. Hochman L, Segev N, Sternberg N, Cohen G. 1983. Site-specific recombination circularization of bacteriophage P1 DNA. *Virology* 131:11–17.
61. Abremski K, Hoess R, Sternberg N. 1983. Studies on the properties of P1 site-specific recombination: evidence for topologically unlinked products following recombination. *Cell* 32:1301–1311.
62. Ghosh K, Van Duyne GD. 2002. Cre-loxP biochemistry. *Methods* 28:374–383.
63. Paul S, Summers D. 2004. ArgR and PepA, accessory proteins for XerCD-mediated resolution of ColE1 dimers, are also required for stable maintenance of the P1 prophage. *Plasmid* 52:63–68.
64. MacDonald AI, Lu Y, Kilbride EA, Akopian A, Colloms SD. 2008. PepA and ArgR do not regulate Cre recombination at the bacteriophage P1 loxP site. *Plasmid* 59:119–126.
65. Ghosh K, Lau C-K, Gupta K, Van Duyne GD. 2005. Preferential synapsis of loxP sites drives ordered strand exchange in Cre-loxP site-specific recombination. *Nat Chem Biol* 1:275–282.
66. Ghosh K, Guo F, Van Duyne GD. 2007. Synapsis of loxP sites by Cre recombinase. *J Biol Chem* 282:24004–24016.
67. Bouet J-Y, Bouvier M, Lane D. 2006. Concerted action of plasmid maintenance functions: partition complexes create a requirement for dimer resolution. *Mol Microbiol* 62:1447–1459.

68. Disqué-Kocher C, Eichenlaub R. 1993. Purification and DNA binding of the D protein, a putative resolvase of the F-factor of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 237:206–214.
69. Lane D, de Feyter R, Kennedy M, Phua SH, Semon D. 1986. D protein of miniF plasmid acts as a repressor of transcription and as a site-specific resolvase. *Nucleic Acids Res* 14:9713–9728.
70. Chen Y, Narendra U, Iype LE, Cox MM, Rice PA. 2000. Crystal structure of a FLP recombinase-Holliday junction complex: assembly of an active oligomer by helix swapping. *Mol Cell* 6:885–897.
71. Guo F, Gopaul DN, Van Duyne GD. 1997. Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse. *Nature* 389:40–46.
72. Guo F, Gopaul DN, Van Duyne GD. 1999. Asymmetric DNA bending in the Cre-loxP site-specific recombination synapse. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7143–7148.
73. Gopaul DN, Guo F, Van Duyne GD. 1998. Structure of the Holliday junction intermediate in Cre-loxP site-specific recombination. *EMBO J* 17:4175–4187.
74. Hickman AB, Waninger S, Scoocca JJ, Dyda F. 1997. Molecular organization in site-specific recombination: the catalytic domain of bacteriophage HP1 integrase at 2.7 Å resolution. *Cell* 89:227–237.
75. Subramanya HS, Arciszewska LK, Baker RA, Bird LE, Sherratt DJ, Wigley DB. 1997. Crystal structure of the site-specific recombinase, XerD. *EMBO J* 16:5178–5187.
76. Gibb B, Gupta K, Ghosh K, Sharp R, Chen J, Van Duyne GD. 2010. Requirements for catalysis in the Cre recombinase active site. *Nucleic Acids Res* 38:5817–5832.
77. Rajeev L, Malanowska K, Gardner JF. 2009. Challenging a paradigm: the role of DNA homology in tyrosine recombinase reactions. *Microbiol Mol Biol Rev* 73:300–309.
78. Lee L, Chu LCH, Sadowski PD. 2003. Cre induces an asymmetric DNA bend in its target loxP site. *J Biol Chem* 278:23118–23129.
79. Fan H-F. 2012. Real-time single-molecule tethered particle motion experiments reveal the kinetics and mechanisms of Cre-mediated site-specific recombination. *Nucleic Acids Res* 40:6208–6222.
80. Pinkney JNM, Zawadzki P, Mazuryk J, Arciszewska LK, Sherratt DJ, Kapanidis AN. 2012. Capturing reaction paths and intermediates in Cre-loxP recombination using single-molecule fluorescence. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:20871–20876.
81. Zawadzki P, May PFJ, Baker RA, Pinkney JNM, Kapanidis AN, Sherratt DJ, Arciszewska LK. 2013. Conformational transitions during FtsK translocase activation of individual XerCD-dif recombination complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:17302–17307.
82. Fan H-F, Ma C-H, Jayaram M. 2013. Real-time single-molecule tethered particle motion analysis reveals mechanistic similarities and contrasts of FLP site-specific recombinase with Cre and λ Int. *Nucleic Acids Res* 41:7031–7047.
83. McCulloch R, Coggins LW, Colloms SD, Sherratt DJ. 1994. Xer-mediated site-specific recombination at *cer* generates Holliday junctions *in vivo*. *EMBO J* 13:1844–1855.
84. Hallet B, Arciszewska LK, Sherratt DJ. 1999. Reciprocal control of catalysis by the tyrosine recombinases XerC and XerD: an enzymatic switch in site-specific recombination. *Mol Cell* 4:949–959.
85. Diagne CT, Salhi M, Crozat E, Salomé L, Cornet F, Rousseau P, Tardin C. 2014. TPM analyses reveal that FtsK contributes both to the assembly and the activation of the XerCD-dif recombination synapse. *Nucleic Acids Res* 42:1721–1732.
86. Arciszewska LK, Baker RA, Hallet B, Sherratt DJ. 2000. Coordinated control of XerC and XerD catalytic activities during Holliday junction resolution. *J Mol Biol* 299:391–403.
87. Chen Y, Rice PA. 2003. New insight into site-specific recombination from FLP recombinase-DNA structures. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 32:135–159.
88. Olorunniji FJ, Stark WM. 2010. Catalysis of site-specific recombination by Tn3 resolvase. *Biochem Soc Trans* 38:417–421.
89. Rowland S-J, Boocock MR, Stark WM. 2006. DNA bending in the Sin recombination synapse: functional replacement of HU by IHF. *Mol Microbiol* 59:1730–1743.
90. Canosa I, López G, Rojo F, Boocock MR, Alonso JC. 2003. Synapsis and strand exchange in the resolution and DNA inversion reactions catalysed by the beta recombinase. *Nucleic Acids Res* 31:1038–1044.
91. Reijns M, Lu Y, Leach S, Colloms SD. 2005. Mutagenesis of *PepA* suggests a new model for the Xer/cre synaptic complex. *Mol Microbiol* 57:927–941.
92. Vazquez M, Colloms SD, Summers DW. 2005. Tangle analysis of Xer recombination reveals only three solutions, all consistent with a single three-dimensional topological pathway. *J Mol Biol* 346:493–504.
93. Sträter N, Sherratt DJ, Colloms SD. 1999. X-ray structure of aminopeptidase A from *Escherichia coli* and a model for the nucleoprotein complex in Xer site-specific recombination. *EMBO J* 18:4513–4522.
94. Bregu M, Sherratt DJ, Colloms SD. 2002. Accessory factors determine the order of strand exchange in Xer recombination at *psi*. *EMBO J* 21:3888–3897.
95. Bregu M, Sherratt DJ, Colloms SD. 2002. Accessory factors determine the order of strand exchange in Xer recombination at *psi*. *EMBO J* 21:3888–3897.
96. Vanhooff V, Normand C, Galloy C, Segall AM, Hallet B. 2010. Control of directionality in the DNA strand-exchange reaction catalysed by the tyrosine recombinase TnpI. *Nucleic Acids Res* 38:2044–2056.
97. Péral K, Cornet F, Merlet Y, Delon I, Louarn JM. 2000. Functional polarization of the *Escherichia coli* chromosome terminus: the *dif* site acts in chromosome dimer resolution only when located between long stretches of opposite polarity. *Mol Microbiol* 36:33–43.
98. Steiner WW, Kuempel PL. 1998. Cell division is required for resolution of dimer chromosomes at the *dif* locus of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 27:257–268.
99. Barre FX, Søballe B, Michel B, Aroyo M, Robertson M, Sherratt DJ. 2001. Circles: the replication-recombination-chromosome segregation connection. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:8189–8195.
100. Cox MM, Goodman MF, Kreuzer KN, Sherratt DJ, Sandler SJ, Mariani KJ. 2000. The importance of repairing stalled replication forks. *Nature* 404:37–41.
101. Lesterlin C, Barre F-X, Cornet F. 2004. Genetic recombination and the cell cycle: what we have learned from chromosome dimers. *Mol Microbiol* 54:1151–1160.
102. Bigot S, Sivanathan V, Possoz C, Barre F-X, Cornet F. 2007. FtsK, a literate chromosome segregation machine. *Mol Microbiol* 64:1434–1441.
103. Dubarry N, Possoz C, Barre F-X. 2010. Multiple regions along the *Escherichia coli* FtsK protein are implicated in cell division. *Mol Microbiol* 78:1088–1100.
104. Iyer LM, Makarova KS, Koonin EV, Aravind L. 2004. Comparative genomics of the FtsK-HerA superfamily of pumping ATPases: implications for the origins of chromosome segregation, cell division and viral capsid packaging. *Nucleic Acids Res* 32:5260–5279.
105. Ptacin JL, Nöllmann M, Becker EC, Cozzarelli NR, Pogliano K, Bustamante C. 2008. Sequence-directed DNA export guides chromosome translocation during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Nat Struct Mol Biol* 15:485–493.
106. Marquis KA, Burton BM, Nöllmann M, Ptacin JL, Bustamante C, Ben-Yehuda S, Rudner DZ. 2008. SpoIIIE strips proteins off the DNA during chromosome translocation. *Genes Dev* 22:1786–1795.
107. Kaimer C, Schenk K, Graumann PL. 2011. Two DNA translocases synergistically affect chromosome dimer resolution in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 193:1334–1340.

108. Aussel L, Barre F-X, Aroyo M, Stasiak A, Stasiak AZ, Sherratt D. 2002. FtsK is a DNA motor protein that activates chromosome dimer resolution by switching the catalytic state of the XerC and XerD recombinases. *Cell* 108:195–205.
109. Yates J, Aroyo M, Sherratt DJ, Barre F-X. 2003. Species specificity in the activation of Xer recombination at dif by FtsK. *Mol Microbiol* 49:241–249.
110. Grainge I, Lesterlin C, Sherratt DJ. 2011. Activation of XerCD-dif recombination by the FtsK DNA translocase. *Nucleic Acids Res* 39:5140–5148.
111. Grainge I, Lesterlin C, Sherratt DJ. 2011. Activation of XerCD-dif recombination by the FtsK DNA translocase. *Nucleic Acids Res* 39:5140–5148.
112. Grainge I, Lesterlin C, Sherratt DJ. 2011. Activation of XerCD-dif recombination by the FtsK DNA translocase. *Nucleic Acids Res* 39:5140–5148.
113. Lee JY, Finkelstein IJ, Crozat E, Sherratt DJ, Greene EC. 2012. Single-molecule imaging of DNA curtains reveals mechanisms of KOPS sequence targeting by the DNA translocase FtsK. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:6531–6536.
114. Graham JE, Sherratt DJ, Szczelkun MD. 2010. Sequence-specific assembly of FtsK hexamers establishes directional translocation on DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:20263–20268.
115. Crozat E, Grainge I. 2010. FtsK DNA translocase: the fast motor that knows where it's going. *ChemBiochem* 11:2232–2243.
116. Stouf M, Meile J-C, Cornet F. 2013. FtsK actively segregates sister chromosomes in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:11157–11162.
117. Grainge I, Bregu M, Vazquez M, Sivanathan V, Ip SCY, Sherratt DJ. 2007. Unlinking chromosome catenanes *in vivo* by site-specific recombination. *EMBO J* 26:4228–4238.
118. Shimokawa K, Ishihara K, Grainge I, Sherratt DJ, Vazquez M. 2013. FtsK-dependent XerCD-dif recombination unlinks replication catenanes in a stepwise manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:20906–20911.
119. Val M-E, Kennedy SP, Karoui El M, Bonné L, Chevalier F, Barre F-X. 2008. FtsK-dependent dimer resolution on multiple chromosomes in the pathogen *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet* 4:e1000201.
120. Val M-E, Kennedy SP, Soler-Bistué AJ, Barre V, Bouchier C, Ducos-Galand M, Skovgaard O, Mazel D. 2014. Fuse or die: how to survive the loss of Dam in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* 91:665–678.
121. Le Bourgeois P, Bugarel M, Campo N, Daveran-Mingot M-L, Labonté J, Lanfranchi D, Lautier T, Pages C, Ritzenthaler P. 2007. The unconventional Xer recombination machinery of *Streptococci/Lactococci*. *PLoS Genet* 3:e117.
122. Debowski AW, Gauntlett JC, Li H, Liao T, Sehna M, Nilsson H-O, Marshall BJ, Benghezal M. 2012. Xer-cise in *Helicobacter pylori*: one-step transformation for the construction of markerless gene deletions. *Helicobacter* 17:435–443.
123. Nolivos S, Pages C, Rousseau P, Le Bourgeois P, Cornet F. 2010. Are two better than one? Analysis of an FtsK/Xer recombination system that uses a single recombinase. *Nucleic Acids Res* 38:6477–6489.
124. Nolivos S, Touzain F, Pages C, Coddeville M, Rousseau P, El Karoui M, Le Bourgeois P, Cornet F. 2012. Co-evolution of segregation guide DNA motifs and the FtsK translocase in bacteria: identification of the atypical *Lactococcus lactis* KOPS motif. *Nucleic Acids Res* 40:5535–5545.
125. Serre M-C, El Arnaout T, Brooks MA, Durand D, Lisboa J, Lazar N, Raynal B, van Tilbeurgh H, Quevillon-Cheruel S. 2013. The carboxy-terminal α N helix of the archaeal XerA tyrosine recombinase is a molecular switch to control site-specific recombination. *PLoS One* 8:e63010.
126. Yano H, Genka H, Ohtsubo Y, Nagata Y, Top EM, Tsuda M. 2013. Cointegrate-resolution of toluene-catabolic transposon Tn4651: determination of crossover site and the segment required for full resolution activity. *Plasmid* 69:24–35.
127. Val M-E, Bouvier M, Campos J, Sherratt D, Cornet F, Mazel D, Barre F-X. 2005. The single-stranded genome of phage CTX is the form used for integration into the genome of *Vibrio cholerae*. *Mol Cell* 19:559–566.
128. Das B, Bischerour J, Barre F-X. 2011. VGJphi integration and excision mechanisms contribute to the genetic diversity of *Vibrio cholerae* epidemic strains. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:2516–2521.
129. Bischerour J, Spangenberg C, Barre F-X. 2012. Holliday junction affinity of the base excision repair factor Endo III contributes to cholera toxin phage integration. *EMBO J* 31:3757–3767.
130. Domínguez NM, Hackett KT, Dillard JP. 2011. XerCD-mediated site-specific recombination leads to loss of the 57-kilobase gonococcal genetic island. *J Bacteriol* 193:377–388.

ANNEXE 2: Tableau de plasmides et souches

1. Tableau des plasmides utilisés dans les projets GGI et méga-plasmides

pFF01	cassette <i>dif_{Ng}-Kn-dif_{Ng}</i> , puC57 Amp ^R -Kn ^R	GGI
pFF02	cassette <i>dif_{GGI}-Kn-dif_{GGI}</i> , puC57 Amp ^R -Kn ^R	GGI
pFF03	cassette <i>dif_{Ng}-Kn-dif_{GGI}</i> , puC57 Amp ^R -Kn ^R	GGI
pROUT8	plasmide pour purifier XerC _{Ng} , pet32b:: <i>xerD_{Ng}</i> (NcoI-BamHI), Amp ^R	GGI
pROUT11	plasmide pour purifier XerD _{Ng} , pet32b:: <i>xerD_{Ng}</i> (NcoI-BamHI), Amp ^R	GGI
pFF11	plasmide pour purifier XerD _{γNg} , pet32b:: <i>xerD_{γNg}</i> (NcoI-SacI), Amp ^R	GGI
pFF13	plasmide d'expression XerD _{γNg} , pBAD18, Amp ^R	GGI
pFF16	plasmide pour purifier XerD _{γYFNg} , pet32b:: <i>xerD_{γYFNg}</i> (NcoI-SacI), Amp ^R	GGI
pFF17	plasmide d'expression XerD _{γYFNg} , pBAD18, Amp ^R	GGI
pCP116	plasmide d'intégration/excision de la cassette <i>dif_{Ng}-Kn-dif_{Ng}</i> , <i>repATs-rpsl</i> , Cm ^R	GGI
pCP118	plasmide d'intégration/excision de la cassette <i>dif_{Ng}-Kn-dif_{GGI}</i> , <i>repATs-rpsl</i> , Cm ^R	GGI
pCP128	plasmide d'expression XerD _{Ng} , pBAD18, Amp ^R	GGI
pCP129	plasmide d'intégration/excision de <i>xerCNg</i> , <i>repATs-rpsl</i> , Cm ^R	GGI
pFF31	cassette <i>Xrs_{R27}-Kn- Xrs_{R27}</i> , puC57 Amp ^R -Kn ^R	Méga-P
pFF32	cassette <i>Xrs_{EQ1}-Kn- Xrs_{EQ1}</i> , puC57 Amp ^R -Kn ^R	Méga-P
pFF36	cassette <i>cer-séquences acc-Kn cer-séquences acc</i> , puC57 Amp ^R -Kn ^R	Méga-P
pFF39	cassette <i>Xrs_{NDM-CIT}-Kn- Xrs_{NDM-CIT}</i> , puC57 Amp ^R -Kn ^R	Méga-P
pFF41	cassette <i>Xrs_{HCM1}-Kn- Xrs_{HCM1}</i> , puC57 Amp ^R -Kn ^R	Méga-P
pFF42	cassette <i>Xrs_{APEC01R}-Kn- Xrs_{APEC01R}</i> , puC57 Amp ^R -Kn ^R	Méga-P
pFF43	cassette <i>Xrs_{APEC02colV}-Kn- Xrs_{APEC02colV}</i> , puC57 Amp ^R -Kn ^R	Méga-P
pFF44	cassette <i>Xrs_{SECIMPQ}-Kn- Xrs_{SECIMPQ}</i> , puC57 Amp ^R -Kn ^R	Méga-P
pFF45	cassette <i>Xrs_{R478}-Kn- Xrs_{R478}</i> , puC57 Amp ^R -Kn ^R	Méga-P
pFF46	cassette <i>Xrs_{WR100}-Kn- Xrs_{WR100}</i> , puC57 Amp ^R -Kn ^R	Méga-P
pFF55	cassette <i>Xrs_{CFSAN}-Kn- Xrs_{CFSAN}</i> , puC57 Amp ^R -Kn ^R	Méga-P
pFF56	cassette <i>Xrs_{IGRW12}-Kn- Xrs_{IGRW12}</i> , puC57 Amp ^R -Kn ^R	Méga-P
pFF57	cassette <i>Xrs_{RS218}-Kn- Xrs_{RS218}</i> , puC57 Amp ^R -Kn ^R	Méga-P

pFF58	cassette <i>XrSPAT9B01-Kn- Xrs PAT9B01</i> , puC57 Amp ^R -Kn ^R	Méga-P
pFF59	cassette <i>XrSRAHAQ01-Kn- Xrs RAHAQ01</i> , puC57 Amp ^R -Kn ^R	Méga-P
pFF62	plasmide d'expression du domaine C-terminal de FtsK _{Ng} sous pLac	GGI
pYP4	plasmide thermo-sensible pGB2Ts (origine pSC10) contenant <i>dif_{Ng}</i> Sp ^R	GGI
pYP5	plasmide thermo-sensible pGB2Ts (origine pSC10) contenant <i>dif_{GGL}</i> Sp ^R	GGI
pCS101	R27 Δ TAtypeI::lacI	Méga-P
pSC109	R27 Δ TAtypeI::lacI Δ dif::Amp ^R	Méga-P
pSC116	R27 Δ TAtypeI::lacI Δ RIPS-Frt-Kn-Frt	Méga-P
pSC116	R27 Δ TAtypeI::lacI Δ dif::Amp ^R Δ RIPS-Frt-Kn-Frt	Méga-P

2. Tableau des souches utilisées dans les projets GGI et méga-plasmides

Nom	Génotype	projet
CP1182	LN2666 Δ (dif) :: dif _{Ng} -Kn-dif _{Ng} , xerC :: frt :: xerC _{Ng} , xerD :: frt	GGI
CP1184	LN2666 Δ (dif) :: dif _{Ng} -Kn-dif _{GGL} , xerC :: frt :: xerC _{Ng} , xerD :: frt	GGI
CP1234	LN2666 Δ (dif) :: dif _{Ng} -Kn-dif _{Ng} , xerC :: frt :: xerC _{Ng} , xerD :: frt ftsK Δ c::Tc ^R	GGI
CP1235	LN2666 Δ (dif) :: dif _{Ng} -Kn-dif _{GGL} , xerC :: frt :: xerC _{Ng} , xerD :: frt ftsK Δ c::Tc ^R	GGI
CP1242	LN2666 Δ (dif) :: dif _{Ng} , xerC :: frt :: xerC _{Ng} , xerD :: frt	GGI
CP1316	LN2666 Δ (dif) :: dif _{Ng} , xerC :: frt :: xerC _{Ng} , xerD :: frt, ftsK Δ c::Tc ^R	GGI
CP1310	LN2666 Δ (dif) :: dif _{Ng} -Kn-dif _{Ng} , xerC :: frt :: xerC _{Ng} , xerD :: frt, ftsK Δ c::Cter _{Ng}	GGI
CP1311	LN2666 Δ (dif) :: dif _{Ng} -Kn-dif _{GGL} , xerC :: frt :: xerC _{Ng} , xerD :: frt, ftsK Δ c::Cter _{Ng}	GGI
DS941	F- thr1 leuB6 D(gpt-pro)62 hisG4oc argE3 ara14 lacY1 galK2 xyl5 mtl1 thi1 tsx33 supE44 rfbD1 mgl51 kdgK51 rac- recF143 lacIq D(lacZ)M15 : AB1157 recF- (Colloms et al., 1990)	Méga-P
DS984	DS941 Δ xerC::Cm ^R (Colloms et al., 1990)	Méga-P
FF01	DS941 Δ pepA::Kn ^R ftsK Δ c::Tc ^R	Méga-P
CS51	DS941 Δ pepA::Kn ^R	Méga-P

FX55	DS941 $\Delta xerD::Kn^R \Delta xerC::xerC-xerD$ (Capiaux et al., 2002)	Méga-P
FX60	FX55 $ftsK1::ftsK::Cm^R$ (Capiaux et al., 2002)	Méga-P
AB1157	<i>F- thr1 leuB6 D(gpt-pro)62 hisG4oc argE3 ara14 lacY1 galK2 xyl5 mtl1 thi1 tsx33 supE44 rfbD1 mgl51 kdgK51 rac-</i>	Méga-P
CP1265	LN2666 $\Delta dif::Xrs_{EQ1}$, HU-GFP-Frt-Kn-Frt	Méga-P
CP1267	LN2666 $\Delta dif::Xrs_{R27}$, HU-GFP-Frt-Kn-Frt	Méga-P
CP1268	LN2666 $\Delta dif::cer$, HU-GFP-Frt-Kn-Frt	Méga-P
CP1269	LN2666 $\Delta dif::Xrs_{NDM-CIT}$, HU-GFP-Frt-Kn-Frt	Méga-P
CP1271	LN2666 $\Delta dif::Xrs_{WR100}$, HU-GFP-Frt-Kn-Frt	Méga-P
CP1272	LN2666 $\Delta dif::Xrs_{HCM1}$, HU-GFP-Frt-Kn-Frt	Méga-P
CP1273	LN2666 $\Delta dif::Xrs_{R478}$, HU-GFP-Frt-Kn-Frt	Méga-P
CP1274	LN2666 $\Delta dif::Xrs_{ICIMPQ}$, HU-GFP-Frt-Kn-Frt	Méga-P
CP1275	LN2666 $\Delta dif::Xrs_{Apec02colV}$, HU-GFP-Frt-Kn-Frt	Méga-P
CP1290	LN2666 $\Delta dif::psi$, HU-GFP-Frt-Kn-Frt	Méga-P
CP1303	LN2666 $\Delta dif::Xrs_{APEC01R}$, HU-GFP-Frt-Kn-Frt	Méga-P
CP1304	LN2666 $\Delta dif::Xrs_{IGRW12}$, HU-GFP-Frt-Kn-Frt	Méga-P
CP1305	LN2666 $\Delta dif::Xrs_{CFSAN}$, HU-GFP-Frt-Kn-Frt	Méga-P
CP1306	LN2666 $\Delta dif::Xrs_{PAT9B01}$, HU-GFP-Frt-Kn-Frt	Méga-P
CP1307	LN2666 $\Delta dif::Xrs_{RAHAQ01}$, HU-GFP-Frt-Kn-Frt	Méga-P
CP1308	LN2666 $\Delta dif::Xrs_{0157-sal}$, HU-GFP-Frt-Kn-Frt	Méga-P
CP1309	LN2666 $\Delta dif::Xrs_{RS218}$, HU-GFP-Frt-Kn-Frt	Méga-P
CP1051	LN2666 HU-mcherryFP-FRT-Kn-FRT	Méga-P
CP1276	LN2666 HU-GFP-FRT-Kn-FRT <i>RecA-Tc^R</i>	Méga-P
CP1279	LN2666 $\Delta dif::Xrs_{EQ1}$, HU-GFP-Frt-Kn-Frt <i>RecA-Tc^R</i>	Méga-P
CP1280	LN2666 $\Delta dif::Xrs_{R27}$, HU-GFP-Frt-Kn-Frt <i>RecA-Tc^R</i>	Méga-P
CP1281	LN2666 $\Delta dif::cer$, HU-GFP-Frt-Kn-Frt <i>RecA-Tc^R</i>	Méga-P
CP1282	LN2666 $\Delta dif::Xrs_{NDM-CIT}$, HU-GFP-Frt-Kn-Frt <i>RecA-Tc^R</i>	Méga-P
CP1284	LN2666 $\Delta dif::Xrs_{WR100}$, HU-GFP-Frt-Kn-Frt <i>RecA-Tc^R</i>	Méga-P
CP1285	LN2666 $\Delta dif::Xrs_{HCM1}$, HU-GFP-Frt-Kn-Frt <i>RecA-Tc^R</i>	Méga-P
CP1286	LN2666 $\Delta dif::Xrs_{R478}$, HU-GFP-Frt-Kn-Frt <i>RecA-Tc^R</i>	Méga-P
CP1287	LN2666 $\Delta dif::Xrs_{ICIMPQ}$, HU-GFP-Frt-Kn-Frt <i>RecA-Tc^R</i>	Méga-P
CP1288	LN2666 $\Delta dif::Xrs_{Apec02colV}$, HU-GFP-Frt-Kn-Frt <i>RecA-Tc^R</i>	Méga-P
CP1300	LN2666 Δdif , HU-GFP-Frt-Kn-Frt	Méga-P

CP1301	LN2666 Δdif , <i>HU-GFP-Frt-Kn-Frt RecA-Tc^R</i>	Méga-P
CP1302	LN2666 $\Delta dif::psi$, <i>HU-GFP-Frt-Kn-Frt RecA-Tc^R</i>	Méga-P
CS87	LN2666 $\Delta lacI::Sp^R$	Méga-P
CS87recA-	LN2666 $\Delta lacI::Sp^R \Delta recA::Cm^R$	Méga-P
CS98	LN2666 $\Delta lacI::Sp^R \Delta xerC-FtsK-Kn-Frt$	Méga-P
CS95	LN2666 $\Delta lacI::Sp^R \Delta xerD-FtsK-Kn-Frt$	Méga-P
CS97	LN2666 $\Delta lacI::Sp^R ftsK_{ATP-}::Cm^R$	Méga-P

ANNEXE 3: Tableau d'oligonucléotides.

1. Oligonucléotides pour les expériences de retard sur gel et HT-TPM

Nom	Sequence 5'-3'	Projet
difNg top	AGTTCGCATAATGTATATTATGTTAAAT	GGI
difNg bottom	ATTTAACATAATATACATTATGCGAACT	GGI
difGGI top	AGTTCGCATAATGTATATTATGTTAAAT	GGI
difGGI bottom	ATTTAACATAATATACATTATGCGAACT	GGI
difE.c top	GGTGCGCATAATGTGTGTTATGTTAAAT	Méga-P
difE.c bottom	ATTTAACATAACACACATTATGCGCACC	Méga-P
XrsR27 top	AGTACATATAACAAAGATTATGTTAAAT	Méga-P
XrsR27 bottom	ATTTAACATAATCTTTGTTATATGTACT	Méga-P
Tpm GGI sens	(Dig)-GTGCCACCTGACGTCTAAG	GGI
Tpm GGI N.sens	(Btn)CCTACAGCGTGAGCTATGAG	GGI

2- Oligonucléotides pour les expériences d'arrêt de translocation

Nom	Sequence 5'-3'	Projet
Transtest sens	(btn)-GCGAGGGCTTTACTAAGCTTG	GGI
Km N.sens	CCGCTTCAGTGACAACGTCG	GGI
Test T N sens	(btn)-GTCGGGAATTCCCGGGGATC	GGI
Km Sens	CGACGTTGTCACTGAAGCGC	GGI
Trans <i>dif_{E.c}</i> sens	(btn)-GAATTCGAGCTCGGTACCCG	Méga-P

Trans <i>dif_{Ec}</i> N.sens	GGTTATTGTCTCATGAGCGG	Méga-P
Trans <i>Xrs_{R27}</i> sens	GTACTGAGAGTGXACCATATG	Méga-P
Trans <i>Xrs_{R27}</i> N sens	(btn)-GAACTCATGAACCTAAGAC	Méga-P

AUTEUR : Florian Fournès

TITRE : Etude du système Xer au travers de la transmission verticale et horizontale de l'information génétique chez les bactéries.

RESUME

Les génomes bactériens sont le siège de deux phénomènes de transferts de l'information génétique: les transferts verticaux et horizontaux. Leur coexistence ce qui implique une délicate balance entre maintenance et instabilité des génomes. L'information génétique des bactéries est généralement portée par des réplicons circulaires : chromosomes et plasmides. Un des sérieux désavantages des réplicons circulaires est leur grande sensibilité aux réarrangements causés par recombinaison homologue. Un nombre impair de crossing-over pendant ou après la réplication de ces réplicons entraîne la formation de molécules dimériques. Ces dimères correspondent à une fusion covalente des deux copies du réplicon, non-résolus les dimères ne ségrégeront pas correctement au moment de la division cellulaire. La résolution des formes multimériques des plasmides et chromosomes circulaires est médiée par un mécanisme de recombinaison spécifique de site efficace et extrêmement contrôlé : le système Xer. Les mécanismes de résolution des dimères de chromosome et de plasmide sont différents. De plus, bien que le système de résolution de dimères de chromosome soit contrôlé dans le temps et dans l'espace, chez de nombreuses bactéries il est détourné de son rôle principal par des éléments génétiques mobiles appelés IMEXs (Integrative Mobile Elements exploiting Xer).

Le système Xer est alors impliqué dans les transferts verticaux et horizontaux de gènes, illustrant comment une même machine moléculaire peut intervenir dans plusieurs processus biologiques. Pour cela, des acteurs externes différents vont jouer un rôle clé dans le contrôle d'une machine Xer centrale et ainsi apporter une diversité de mécanismes, chacun dédié à une processus biologique propre. Afin de mieux comprendre les contrôles différentiels du système Xer, je me suis intéressé aux éléments génétiques mobiles. *Via* l'étude de la stabilité intra-chromosomique des IMEXs et de la résolution des dimères de certains grands plasmides, j'ai pu montrer que FtsK, la protéine activatrice de la résolution des dimères de chromosome, est impliquée dans la stabilisation des éléments acquis par transferts horizontaux de gènes.

MOTS CLES : Système Xer, IMEXs, méga-plasmides, site de recombinaison, FtsK